

Aus dem Anatomischen Institut

(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Ralph Lucius)

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

UNTERSUCHUNG DES NEUROPROTEKTIVEN POTENTIALS VON PYCNOGENOL® ANHAND DER WIRKUNG AUF MIKROGLIAZELLEN

Inauguraldissertation zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Clara Johanna Vollenberg

aus Dortmund

Kiel, 2016

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ralph Lucius,
Anatomisches Institut

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Herdegen,
Institut für Experimentelle und Klinische
Pharmakologie

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2017

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 24.02.2017

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender des Prüfungsausschusses)

Inhaltsverzeichnis

I Abbildungsverzeichnis	IV
II Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung.....	1
1.1 Neurodegeneration in einer alternden Gesellschaft.....	1
1.2 Das Idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS).....	2
1.2.1 Definition und Klassifikation	2
1.2.2 Epidemiologie	3
1.2.3 Neuropathologie	3
1.3 Immunreaktionen im Zentralnervensystem.....	4
1.4 Die Rolle der Mikroglia bei der Immunabwehr und der Pathogenese des IPS	4
1.5 Mediatoren von inflammatorischen Prozessen im ZNS	5
1.5.1 Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β).....	6
1.5.2 Interleukin-6 (IL-6)	6
1.5.3 Cyclooxygenase-2 (COX-2)	7
1.5.4 Matrixmetalloproteinasen (MMP).....	7
1.5.5 Stickstoffmonoxid (NO).....	8
1.5.6 Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK)	9
1.6 LPS als Induktor proinflammatorischer Mikrogliareaktionen	9
1.7 Therapieansätze zur Prävention des IPS	10
1.7.1 Pycnogenol [®] (PYC)	10
1.8 Fragestellung	14
2. Material	15
2.1 Chemikalien und Reagenzien.....	15
2.2 anzusetzende Lösungen, Medien und Puffer	17
2.3 Biochemische Kits, Enzyme und Primer	20

2.4 Antikörper.....	21
2.5 Verbrauchsmaterialien	22
2.6 Geräte und Apparaturen	23
2.7 Computersoftware.....	24
3. Methoden.....	25
3.1 Isolierung und Kultivierung primärer Mikroglia	25
3.2 Untersuchungen zum Einfluss von Pycnogenol® auf Mikrogliazellen.....	27
3.2.1 MTT-Test	27
3.2.2 Coomassie-Färbung.....	27
3.2.3 Isolierung der Gesamt-RNA	28
3.2.4 Reverse Transkription	29
3.2.5 Quantitative Real-time PCR (qPCR).....	30
3.2.6 Indirekte Stickstoffmonoxidmessung mittels Griess-Reagenz	31
3.2.7 ELISA zum Nachweis von IL-6 und TNF- α	31
3.2.8 Western-Blot-Analyse	32
4. Ergebnisse.....	36
4.1 PYC steigert die Zellviabilität primärer Mikroglia	36
4.2 PYC beeinflusst die Morphologie primärer Mikroglia	37
4.3 PYC beeinflusst die mRNA-Menge und die Proteinfreisetzung von Entzündungsmediatoren in primärer Mikroglia	39
4.3.1 PYC senkt die mRNA-Menge von Entzündungsmediatoren nach LPS-Stimulation .	39
4.3.2 PYC beeinflusst die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine	45
4.4 PYC steigert die Freisetzung von NO unabhängig von der induzierbaren NO-Synthase (iNOS).....	48
4.4.1 PYC steigert die NO-Freisetzung durch primäre Mikroglia	48
4.4.2 PYC senkt die mRNA-Menge der induzierbaren NO-Synthase nach LPS-Stimulation	49

4.5 PYC reduziert die Aktivierung von MAPK-Signalwegen in primärer Mikroglia nach LPS-Stimulation.....	50
5. Diskussion.....	52
5.1 <i>In-vitro</i> -Kultivierung der Mikroglia	53
5.1.2 Grenzen des <i>in-vitro</i> -Modells	54
5.2 Einfluss von PYC auf primäre Mikroglia	55
5.2.1 PYC steigert die Zellviabilität primärer Mikroglia	55
5.2.2 PYC beeinflusst die Morphologie primärer Mikroglia	56
5.2.3 PYC senkt die mRNA-Menge von Entzündungsmediatoren in primärer Mikroglia nach LPS-Stimulation	57
5.2.4 PYC beeinflusst die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine	59
5.2.5 PYC steigert die Freisetzung von NO unabhängig von der induzierbaren NO-Synthase (iNOS).....	60
5.2.6 PYC reduziert die Aktivierung von MAPK-Signalwegen in primärer Mikroglia nach LPS-Stimulation	61
5.3 Schlussfolgerungen und Ausblick	63
6. Zusammenfassung.....	65
Literaturverzeichnis.....	67
Lebenslauf	74

I Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Mögliche oligomere Anordnung der in PYC enthaltenen Flavan-3-ol-Monomere Catechin und Epicatechin zu oligomeren Proanthocyanidinen (OPC).	12
Abb. 2 Einfluss von PYC auf die Formazan-Bildungsrate in primärer Mikroglia.	37
Abb. 3 Einfluss von PYC auf die Morphologie primärer Mikroglia.	38
Abb. 4 Einfluss von PYC auf die mRNA-Menge von TNF- α in primärer Mikroglia.	40
Abb. 5 Einfluss von PYC auf die mRNA-Menge von IL-1 β in primärer Mikroglia.	41
Abb. 6 Einfluss von PYC auf die mRNA-Menge von IL-6 in primärer Mikroglia.	42
Abb. 7 Einfluss von PYC auf die mRNA-Menge von COX-2 in primärer Mikroglia.	43
Abb. 8 Einfluss von PYC auf die mRNA-Menge von MMP-9 in primärer Mikroglia.	44
Abb. 9 Einfluss von PYC auf die Freisetzung von TNF- α in den Zellkulturüberstand primärer Mikroglia.	46
Abb. 10 Einfluss von PYC auf die IL-6-Freisetzung in den Zellkulturüberstand primärer Mikroglia.	47
Abb. 11 Einfluss von PYC auf die LPS-induzierte NO-Freisetzungsrage in primärer Mikroglia.	48
Abb. 12 Einfluss von PYC auf die mRNA-Menge von iNOS in primärer Mikroglia.	49
Abb. 13 Einfluss von PYC a auf die Phosphorylierung von p38 und b ERK1/2 in primärer Mikroglia.	50
Abb. 14 Prozentualer Anteil an pp38 und pERK1/2	51
Abb. 15 Wirkung von PYC auf LPS-aktivierte Mikrogliazellen im Rahmen der Pathogenese des IPS.	63

II Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BSA	Bovines Serumalbumin
CD(-4)	Unterscheidungsgruppe (<i>Cluster of differentiation</i>)
COX(-1/2)	Cyclooxygenase
CVI	Chronisch-venöse Insuffizienz
DNA, cDNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	N,N-Dimethylformamid
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline Solution</i>
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunsorbent Assay</i>
EDRF	<i>Endothelial-derived relaxing factor</i>
ERK (-1/2), pERK	Extrazellulär regulierte Kinasen, phosphorylierte ERK
FKS	Fetales Kälberserum
fMLP	N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin
HCl	Chlorwasserstoff, Salzsäure
HEPES	2-4-Hydroxyethyl-1-piperazinyl-Ethansulfonsäure
HLPC	<i>high-performance liquid chromatographic</i>
IL(-1 β /6/10)	Interleukin
IPS, PS	Idiopathisches Parkinson-Syndrom, Parkinson-Syndrom
JAK(-1)	Januskinase
JNK(-1/2)	Jun-N-terminale Kinase
L-Dopa	Levodopa
LOX	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
MAO	Monoaminoxidase
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinasen
MHC(-II)	Hauptgewebeverträglichkeitskomplex (<i>Major histocompatibility complex</i>)

MMP(-3,-9)	Matrix-Metalloprotease
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorit
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NF(-κB)	Nukleärer Faktor
NO	Stickstoffmonoxid
(c/e/i/n) NOS	(konstitutive/induzierbare/endotheliale/neuronale) NO-Synthase
NSAID	Nichtsteroideale Entzündungshemmer (<i>non-steroidal anti-inflammatory drug</i>)
O ₂ ⁻	Superoxid-Anion
OH ⁻	Hydroxyl-Radikal
ONOO ⁻	Peroxynitrit
OPC	Oligomere Proanthocyanidine
PG-E ₂	Prostaglandin-E ₂
PYC	Pycnogenol®
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>)
RNA, mRNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleid-acid</i>), Boten-RNA (<i>messenger-RNA</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
STAT(-3)	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TBST	TRIS-buffered Saline Tween
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF(-β)	<i>Transforming growth-factor</i>
TLR(-4)	<i>toll-like receptor</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF(-α)	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
USP	Arzneibuch der vereinigten Staaten von Amerika (<i>United States Pharmacopeia</i>)
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1 Neurodegeneration in einer alternden Gesellschaft

„Altern ist schon eine Zumutung“, so konstatierte der Humorist Vicco von Bülow, auch bekannt als Lorient, in einem seiner letzten Interviews mit der „Süddeutschen Zeitung“. Neben einer wachsenden Zahl kleiner Übel: „Ächzendes Verlassen des Taxis, Zögern bei der letzten Treppenstufe, Unauffindbarkeit des zweiten Mantelärmels, zu Hilfe eilende junge Damen...“, ärgerte ihn besonders seine Vergesslichkeit. Im Zuge des natürlichen Alterungsprozesses kommt es zu einer langsamen Abnahme der Organfunktionen im menschlichen Körper, die auch vor Gehirn und Nervensystem nicht Halt macht. Der irreversible Verlust von Nervengewebe, insbesondere von Neuronen, kann im Alter oft nicht mehr kompensiert werden und geht mit einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität auf wirtschaftlicher und sozialer Ebene einher. Man spricht in diesem Fall von neurodegenerativen Erkrankungen (Hung et al. 2010). Besondere Aufmerksamkeit galt bisher vor allem den Demenzerkrankungen wie dem *Morbus Alzheimer*, die durch einen progressiven Verlust kognitiver Funktionen und Alltagskompetenzen gekennzeichnet sind. Experten schätzen die Zahl der Demenzkranken in Deutschland auf etwa eine Million. Nach dem *Morbus Alzheimer* stellt das Idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS) die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung dar, welche vor allem die Basalganglien und somit den Ablauf von Bewegungsabläufen und den Muskeltonus beeinflusst und insgesamt zu einer verminderten Motorik führt (Mumenthaler & Mattle 2008, deLau & Breteler 2006). Weitere neurodegenerative Erkrankungen sind beispielsweise der *Morbus Huntington*, die *Amyotrophe Lateralsklerose* oder die infektiöse Prionen-Erkrankung *Creutzfeldt-Jacob*. Aufgrund des demografischen Wandels kann mit einem weiteren Anstieg von neurodegenerativen Erkrankungen gerechnet werden. Im Jahre 2050 könnte die Anzahl nach Einschätzung des Deutschen Zentrums für neurodegenerative Erkrankungen bereits bei drei Millionen liegen und somit zur zunehmenden wirtschaftlichen und sozialen Belastung werden. Bisher stehen für das IPS ausschließlich symptomatische Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung (Hickey & Stacy 2011). Es ist also dringend erforderlich, die initiale Pathogenese und die auslösenden Faktoren für diese Erkrankungen zu erforschen und neue therapeutische Möglichkeiten zur Prävention oder Heilung zu eröffnen.

1.2 Das Idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS)

1.2.1 Definition und Klassifikation

Im Jahre 1817 beschrieb der englische Arzt James Parkinson erstmals seine Beobachtungen der „Schüttellähmung“, die von Jean-Martin Charcot weiter differenziert wurden. Es ergaben sich charakteristische motorische Kardinalsymptome, durch die sich das Parkinson- Syndrom (PS) bis heute definiert:

- Akinese als Leitsymptom, ohne das die Diagnose nicht gestellt werden kann. Genau genommen lassen sich verschiedene Komponenten der PS-assoziierten Beweglichkeitsstörung differenzieren, nämlich eine Bewegungsverlangsamung (Bradykinese), eine Verminderung der Bewegungsamplituden (Hypokinese) sowie eine Hemmung des Bewegungsstarts (Akinese). Im klinischen Sprachgebrauch werden diese Begriffe allerdings synonym verwendet.
- Rigor
- Ruhetremor
- Störungen der posturalen (gleichgewichtsregulierenden) Reflexe

Weiterhin kann die Okulomotorik beim PS geringfügig gestört sein. Häufig kommt es zu Störungen der Sprech- und Stimmmotorik wie Stottern, welches durch eine Starthemmung bei Sprechbeginn gekennzeichnet ist.

Obwohl es sich beim PS in erster Linie um eine Bewegungsstörung handelt, ergeben sich folgende fakultative nichtmotorische Begleitsymptome:

- sensorische Symptome wie Parästhesien, Schmerzen, Taubheitsgefühle sowie Hyposmie (verminderte Geruchswahrnehmung) oder Störungen des visuellen Systems (Farbdiskrimination und Sehschärfe).
- vegetative Symptome (orthostatische Hypotension, Temperaturdysregulation mit Schweißausbrüchen, Störungen der Darm-, Blasen- und Sexualfunktionen wie Obstipation, Miktions- und Potenzstörungen)
- neuropsychiatrische Symptome wie Depression und Angst
- Kognitive Symptome wie Demenz (vor allem in fortgeschrittenen Stadien)

(Ceballos-Baumann & Conrad 2005, Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2012).

Der *Morbus Parkinson* im engeren Sinne wird im deutschsprachigen Raum oft als IPS bezeichnet und ist von genetischen Formen des PS, dem PS im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen sowie symptomatischen (sekundären) PS abzugrenzen.

Das IPS macht 75% aller PS aus. Für die Diagnose des IPS ist, in Abgrenzung zu anderen Parkinson-Syndromen, ein einseitiger Beginn und eine Seitenasymmetrie der Kardinalsymptome im Verlauf der Erkrankung sowie ein gutes Ansprechen auf Levodopa (L-Dopa) charakteristisch (Ceballos-Baumann & Conrad 2005, Gelb et al. 1999).

1.2.2 Epidemiologie

Das IPS ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach dem *Morbus Alzheimer*. Die Prävalenz in Industrieländern liegt bei 0,3% der Gesamtbevölkerung. Das IPS ist altersassoziiert und manifestiert sich meist erst nach dem 60. Lebensjahr. So sind bei den 65-69 Jährigen etwa 1% erkrankt, bei den über 80 Jährigen bis zu 3%. Mit Veränderung der Altersstruktur der Bevölkerung ist in Zukunft mit einer weiter steigenden Zahl an Patienten zu rechnen (deLau & Breteler 2006).

1.2.3 Neuropathologie

Beim IPS kommt es unter Bildung charakteristischer intrazellulärer Einschlusskörper (Lewy-Körper) zur Degeneration von dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra Pars compacta*. Die klassischen motorischen Symptome in Folge des Dopamin-Mangels im *Corpus Striatum* treten allerdings erst ab einem nigralen Zellverlust von etwa 60% auf (Ceballos-Baumann & Conrad 2005). Der neurodegenerative Prozess ist nicht auf die *Substantia nigra* beschränkt und betrifft auch andere Hirnareale sowie nicht-dopaminerge Neurone. In der Folge kommt es zum Auftreten der nicht-motorischen Begleitsymptome (Ceballos-Baumann & Conrad 2005, Hirsch et al. 2012). Die Ursachen für die Entstehung des IPS sind bis heute nicht abschließend geklärt. Es ist von einem multifaktoriellen Geschehen auszugehen, was letztendlich zu dem typischen Krankheitsbild führt. Die weit verbreitete Hypothese des oxidativen Stresses geht von zytotoxisch wirkenden Oxidradikalen aus, die im Dopaminstoffwechsel entstehen. Hierbei führt vermutlich eine Inhibition des mitochondrialen Komplex 1 der Atmungskette zur Verhinderung des Abbaus des Proteins α -Synuclein, welches sich mit Ubiquitin in Form von Lewy-Körpern ablagert. In der Folge kommt es zur Apoptose der Dopaminneurone (Ceballos-Baumann & Conrad 2005, Dawson & Dawson 2003). Zudem wurden verschiedene genetische Faktoren wie beispielsweise Mutationen im α -Synuclein- oder Ubiquitingen im Zusammenhang mit dem IPS und anderen PS identifiziert (Ceballos-Baumann & Conrad 2005). Weiterhin lieferten *Post-mortem*-Studien klare Hinweise auf eine Beteiligung inflammatorischer Prozesse an der Pathogenese

des IPS. So zeigte sich ein Anstieg reaktiver Mikroglia in der *Substantia nigra* von IPS-Patienten mit vermehrter Freisetzung potentiell neurotoxischer Entzündungsmediatoren (Hirsch & Hunot 2009). Mikrogliazellen sind als die Makrophagen des Zentralnervensystems (ZNS) maßgeblich an der Vermittlung von Immun- und Entzündungsreaktionen beteiligt. Auf die Rolle der Mikroglia in der Pathogenese des IPS und die Besonderheiten von Immunreaktionen im ZNS soll im Folgenden näher eingegangen werden.

1.3 Immunreaktionen im Zentralnervensystem

Im Zentralnervensystem (ZNS) laufen Immunreaktionen verglichen mit dem restlichen Organismus streng kontrolliert ab und werden durch verschiedene Mechanismen unterdrückt. Dieses „Immunprivileg“ ist wichtig, um einen Verlust von Neuronen zu vermeiden, die wegen ihres postmitotischen Charakters unersetzbar sind. Zum einen verhindert die Blut-Hirn-Schranke (BHS) das unkontrollierte Eindringen von Immunzellen in das Hirngewebe, zum anderen kann antigenes Material das ZNS nicht verlassen, da keine Anbindung an das lymphatische System besteht. Dennoch ist die BHS nicht völlig undurchdringlich für Immunzellen und Entzündungsmediatoren, welche in geringem Maße in das ZNS übertreten und neben der residenten Mikroglia wichtige Überwachungs- und Schutzfunktionen übernehmen (Ousman & Kubes 2012, Ullrich 2005).

1.4 Die Rolle der Mikroglia bei der Immunabwehr und der Pathogenese des IPS

Mikrogliazellen sind die Makrophagen des ZNS. Es handelt sich um Zellen mesenchymaler Herkunft, die während der Embryonalentwicklung in das ZNS einwandern, wo sie residente Zellpopulationen bilden, die sich weitgehend selbst unterhalten. Zudem wird vermutlich ein geringer Anteil der Mikrogliazellen aus Monozyten oder fetalen Makrophagen rekrutiert (Chan et al. 2007, Kettenmann et al. 2011). Die Mikroglia ist maßgeblich an der Eliminierung von Pathogenen, Zelldetritus und verschiedenen Neurotoxinen beteiligt und somit potentiell neuroprotektiv. Mikrogliazellen sind morphologisch dynamisch. Unter physiologischen Bedingungen liegen Mikrogliazellen in ihrer scheinbar ruhenden, ramifizierten Form vor. Mit Hilfe zahlreicher verzweigter Ausläufer überwachen sie ihre Umgebung und übernehmen wichtige Funktionen bei der Homöostase im ZNS. In Folge von Schädigungen im ZNS wie Infektion, Trauma, Ischämie oder im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen kommt es zunächst zur schnellen, lokalen Immunantwort, indem die Mikroglia aktiviert wird. Sie vermittelt insbesondere die angeborene Immunantwort (Cherry et al. 2014, Kim & Vellis

2005). Aktivierte Mikrogliazellen zeigen sich plump und amöboid mit verdickten, kurzen und retrahierten Ausläufern und sind phagozytotisch tätig (Kettenmann et al. 2011, Kreutzberg 1996). Sie fungieren als effiziente antigenpräsentierende Zellen und exprimieren als solche *Major Histocompatibility Complex* (MHC) II, sowie kostimulatorische Moleküle, die unter anderem für die T-Zell-Aktivierung notwendig sind. Zudem produzieren sie Zytokine und Chemokine mit zahlreichen biologischen Funktionen (Kim & Vellis 2005, Saijo & Glass 2011). Bei Mikroglia unterscheidet man analog zu Makrophagen zwischen der klassischen Aktivierung (M1) und der alternativen Aktivierung (M2). Mikrogliazellen vom M1-Typ setzen im Rahmen von Immunreaktionen verschiedene proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) sowie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO) frei. Dagegen sezernieren Mikrogliazellen vom M2-Typ antiinflammatorische Zytokine wie zum Beispiel Interleukin 10 (IL-10) und Wachstumsfaktoren (Cherry et al. 2014, Tam & Ma 2014). Teilweise können pathogene Mechanismen durch die angeborene Abwehr allein nicht eliminiert werden. Dann kommt es durch die ausgeschütteten Moleküle zur Permeabilitätssteigerung der BHS und zur Einwanderung von Zellen der erworbenen Immunabwehr (da Fonseca et al. 2014). Zudem können Mikrogliazellen als Antigen-präsentierende Zellen über MHC-II T-Zellen aktivieren und auf diese Weise unter anderem zur Bildung eines immunologischen Gedächtnisses beitragen. Sie nehmen somit eine Vermittlerrolle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem ein (Olson & Miller 2004, Saijo & Glass 2011). Neben ihrem Einfluss auf Leukozyten wirken die ausgeschütteten Entzündungsmediatoren potentiell zytotoxisch auf Neuronen. In Folge einer Schädigung von Neuronen kommt es reaktiv zu einer verstärkten Immunantwort, die die neurodegenerativen Prozesse weiter vorantreibt (Hirsch et al. 2012, Pessoa Rocha et al. 2015). Beim IPS kommt es vermutlich induziert durch α -Synuclein-Aggregate oder in Folge von genetischen Defekten oder Alterungsprozessen über eine gesteigerte Mikroglia-Aktivierung zur Induktion neuroinflammatorischer Prozesse, die mit der Degeneration dopaminerger Neurone assoziiert sind (Dawson & Dawson 2003, Khan et al. 2013, Pessoa Rocha et al. 2015).

1.5 Mediatoren von inflammatorischen Prozessen im ZNS

Über eine Vielzahl von Zytokinen, Enzymen und bestimmten Signaltransduktionswegen kommt es zur Vermittlung von Entzündungsreaktionen im ZNS. Zytokine sind körpereigene Peptide und an der Regulation zahlreicher biologischer Prozesse beteiligt.

Proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) bilden ein komplexes Netzwerk gegenseitiger Beeinflussung im ZNS. *Post-mortem*-Studien zeigten in den Basalganglien und im Liquor von Parkinson-Patienten erhöhte Level dieser Zytokine, was für eine Involvierung von inflammatorischen Prozessen in die Pathogenese des IPS spricht (Mogi et al. 1996). Weiterhin kommt es durch diese Zytokine zur vermehrten Induktion entzündungsassoziierter Enzyme wie Cyclooxygenase-2 (COX-2), der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) oder Matrix-Metalloproteinasen (MMP) (Hirsch et al. 2012, Hirsch & Hunot 2009, Pessoa Rocha et al. 2015, Rosenberg 2009, Xia et al. 2015). Über eine massive Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) durch die iNOS kann es zur Vermittlung von oxidativem und nitrosativem Stress kommen, dem eine entscheidende Rolle bei der Degeneration dopaminerger Neurone beim IPS zugeschrieben wird (Tsang & Chung 2009). Außerdem trägt eine Hochregulierung bestimmter Signalwege wie den mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Kaskaden oder dem nukleären Faktor- κ B (NF- κ B) zur Neurodegeneration bei (Flood et al. 2011, Kim & Choi 2010).

1.5.1 Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β)

IL-1 β und TNF- α sind wichtige proinflammatorische Zytokine, die bei Überexpression schädliche Auswirkungen im ZNS haben. Die Zytokine entfalten ihre biologische Wirkung über ihre Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren auf den entsprechenden Zielzellen. Aufgrund der hohen Affinität für ihre Liganden kann schon eine geringe Zytokinmenge zur Auslösung einer intrazellulären Signalkaskade führen. Obwohl IL-1 β und TNF- α an strukturell nicht verwandte Rezeptoren andocken, kommt es zur Auslösung ähnlicher Effekte. Beide aktivieren Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise NF- κ B sowie Serin/Threonin Proteinkinasen. Über Caspase-Signalwege vermitteln sie Apoptose und steigern zudem die Produktion des hoch reaktiven Gases NO (Wang & Shuaib 2002).

1.5.2 Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 ist ebenfalls ein an Entzündungsreaktionen beteiligtes Zytokin mit komplexer Funktionsweise. Es nimmt eine wichtige Rolle im Übergang von angeborener zu erworbener Immunabwehr innerhalb von Entzündungsprozessen ein (Jones 2005, Scheller et al. 2011). Die Transkription von IL-6 wird unter anderem über den Transkriptionsfaktor NF- κ B sowie durch TNF- α oder IL-1 β induziert (Akira et al. 1990). Die Signalvermittlung erfolgt über das Glykoprotein gp130. Zum einen kann IL-6 an einen membrangebundenen IL-6-Rezeptor

binden, der mit gp130 assoziiert ist. Zum anderen kann IL-6 an einen löslichen IL-6-Rezeptor binden; der entstandene Komplex bindet wiederum gp130. Interessanterweise exprimieren nur wenige Zellen wie Makrophagen, Neutrophile und einige T-Zellen den membrangebundenen IL-6-Rezeptor, während gp130 ubiquitär vorkommt. In Anwesenheit des löslichen IL-6-Rezeptors kann dieses Zytokin also auf deutlich mehr Zellen wirken. Dieser Prozess wird als *trans-signaling* bezeichnet und spielt eine wichtige Rolle bei Immunreaktionen. Bei beiden Wegen kommt es unter anderem zur Aktivierung des MAPK-Weges und infolgedessen zur Transkription bestimmter Zielgene (Akira et al. 1990, Scheller et al. 2011).

1.5.3 Cyclooxygenase-2 (COX-2)

Die COX existiert in 2 Isoformen. Während die COX-1 in nahezu allen Zelltypen konstitutiv vorkommt, wird die COX-2 als die induzierbare Form der COX, durch Wachstumsfaktoren, MAPK-Signalwege, sowie verschiedene Zytokine wie IL-1 β , TNF- α oder IL-6 im Rahmen von Entzündungs- und Immunreaktionen vermehrt exprimiert (Sobolewski et al. 2010, Xia et al. 2015). COX-2 ist also vermutlich an neurodegenerativen Prozessen beteiligt. Über den Anstieg von COX-2 kommt es zur gesteigerten Synthese von Prostaglandin-E₂ (PG-E₂), welches bei Überproduktion die COX-assoziierte Neurotoxizität vermittelt. Weiterhin trägt COX-2 im Rahmen ihrer Peroxidaseaktivität wahrscheinlich zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und somit zu oxidativem Stress im Rahmen des IPS bei (Bartels & Leenders 2010).

1.5.4 Matrixmetalloproteinasen (MMP)

MMP sind proteolytische Enzyme und in inflammatorische Prozesse im ZNS involviert, indem sie die Aktivierung von Wachstumsfaktoren, Todesrezeptoren und anderen Signalmolekülen kontrollieren und die Permeabilität der BHS erhöhen. MMP werden als inaktive Vorstufen, sogenannte Zymogene, unter anderem durch Mikroglia sezerniert und durch Spaltung eines Propeptids aktiviert. MMP-9 kann beispielsweise durch andere Proteasen wie MMP-3 oder freie Radikale wie NO aktiviert werden. MMP werden in geringen Konzentrationen konstitutiv produziert und meist in den Extrazellulärraum sezerniert. Induziert durch Zytokine wie TNF- α oder IL1- β sowie über NF- κ B kommt es zu einer schnellen Steigerung der Genexpression dieser Enzyme im Rahmen neuroinflammatorischer Prozesse. Über eine Degradation von Extrazellulärmatrixbestandteilen durch MMP kommt es zur Schädigung des

betroffenen Gewebes wie zum Beispiel zur Degeneration dopaminerger Neurone beim IPS (Rosenberg 2009).

1.5.5 Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein kleines, elektrisch neutrales und hoch reaktives Molekül, welches sich mittels Diffusion leicht und schnell im Körper verteilen kann (Steinert et al. 2010). NO wurde ursprünglich als *endothelial-derived relaxing factor* (EDRF) in seiner Funktion als Vasodilatator identifiziert (Furchgott & Zawadzki 1980, Steinert et al. 2010). Zudem ist NO aufgrund seiner zahlreichen Reaktionspartner ein vielseitiger Mediator von Immun- und Entzündungsreaktionen (Bogdan 2001). Im Gehirn fungiert es als Neurotransmitter und spielt eine wichtige Rolle bei der synaptischen Plastizität. Andererseits ist NO in die Pathogenese verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen wie auch dem IPS involviert (Steinert et al. 2010). Die NO-Synthese erfolgt durch sogenannte NO-Synthasen, welche in drei Isoformen vorliegen. Die neuronale NO-Synthase (nNOS) wird vor allem in Neuronen und einigen anderen Zelltypen exprimiert und ist an der synaptischen Plastizität sowie der zentralen Blutdruckregulation beteiligt. Das von nNOS synthetisierte NO fungiert als Neurotransmitter und wirkt über periphere Nerven vasodilatatorisch. Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) wird hauptsächlich in Endothelzellen exprimiert und reguliert zahlreiche essentielle kardiovaskuläre Funktionen. Durch das von ihr freigesetzte NO kommt es zur Relaxation der glatten Muskelzellen und infolgedessen zur Vasodilatation. Zudem hemmt NO die Thrombozytenaggregation (Förstermann & Sessa 2012). Sowohl nNOS als auch eNOS werden konstitutiv exprimiert, kalziumabhängig aktiviert und produzieren NO in relativ geringen Mengen (nanomolar). Dagegen wird die induzierbare NO-Synthetase (iNOS) in Folge von inflammatorischen und immunologischen Reaktionen durch Zytokine oder Bakterienbestandteile vermehrt exprimiert. Die iNOS kommt in Zellen der Abwehr wie Makrophagen oder Mikrogliazellen vor, kann aber auch in zahlreichen anderen Zellen induziert werden. Im Gegensatz zu den konstitutiv exprimierten NOS wird die iNOS nicht über intrazelluläre Kalziumkonzentrationen reguliert und ist durchgängig aktiv. Einmal exprimiert, synthetisiert sie große Mengen von NO (mikromolar) (Förstermann & Sessa 2012, Steinert et al. 2010). In hohen Konzentrationen wirkt NO und insbesondere sein Folgeprodukt Peroxynitrit (ONOO^-) zytotoxisch und induziert Apoptose und Nekrose. ONOO^- entsteht bei der Reaktion von NO mit dem Superoxid-Anion (O_2^-) und löst über eine direkte

Oxidierung von Lipiden, DNA und Proteinen oder indirekte, radikalvermittelte Mechanismen oxidativen Stress aus (Pacher et al. 2007).

1.5.6 Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK)

Die MAPK-Signalwege sind mit der Regulation von Zelldifferenzierung, Proliferation, Überleben oder Zelltod assoziiert und spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion im Rahmen entzündlicher Prozesse. Bei den MAPK handelt es sich um Serin-Threonin-Kinasen, welche sich in verschiedene Unterfamilien einteilen lassen. Hierzu zählen die extrazellulär regulierte Kinasen (ERK) mit den Isoformen ERK1 und ERK2, die Jun-N-terminale Kinasen 1 (JNK1) und JNK2, sowie die p38-Kinasen. Die MAPK-Signalwege bestehen jeweils aus hintereinander geschalteten Kinasen, welche Phosphorylierungskaskaden bilden (Kim & Choi 2010). Die ERK werden vor allem durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sowie verschiedene Zytokine aktiviert, während die JNK und die p38-Kinasen hauptsächlich durch Stressreize wie UV-Licht, Wasserstoffperoxid oder reaktive Sauerstoffspezies und Zytokine stimuliert werden. Störungen der MAPK-Signalwege sind an der Pathogenese verschiedener Krankheiten wie *Morbus Alzheimer*, dem IPS, der *Amyotrophischen Lateralsklerose* sowie Malignomen beteiligt (Kim & Choi 2010, Kim & Vellis 2005).

1.6 LPS als Induktor proinflammatorischer Mikrogliareaktionen

Mikrogliazellen wie Makrophagen sind in der Lage, bestimmte Bestandteile von Bakterien und Pilzen zu detektieren und infolgedessen eine schnelle Immunantwort in Gang zu setzen. Die entsprechenden Rezeptoren sind sogenannte *toll-like-receptors* (TLR). Lipopolysaccharid (LPS) ist Oberflächenbestandteil gramnegativer Bakterien und dient als anerkannter Induktor proinflammatorischer Mikrogliareaktionen. Über einen Rezeptorkomplex des mit CD14 assoziierten TLR4 und LPS kommt es über eine Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden zur vermehrten Expression von Entzündungsmediatoren sowie zur Freisetzung freier Radikale (Dutta et al. 2008). Neuroinflammatorische Stimuli induzierten in primären mesenzephalen Zellkulturen aus Rattenembryos des Stammes *Sprague Dawley* eine Degeneration dopaminerger Neurone (Gayle et al. 2002). Das LPS-Modell ist also gut geeignet, um die Rolle inflammatorischer Prozesse sowie der Mikroglia- vermittelten Neurotoxizität bei der Pathogenese des IPS zu untersuchen.

1.7 Therapieansätze zur Prävention des IPS

Bisher gibt es nur symptomatische Therapieansätze für das IPS. Basis der pharmakologischen Behandlungsstrategie ist die medikamentöse Dopaminsubstitution durch Gabe der Dopaminvorstufe L-Dopa oder direkt wirksamer Dopaminagonisten. Des Weiteren kann der Abbau des endogenen Dopamins durch MAO-B-Hemmer verhindert werden. In fortgeschrittenen Stadien ist die tiefe Hirnstimulation fester Bestandteil der Therapie des IPS (Ceballos-Baumann & Conrad 2005). Basierend auf der Annahme, dass oxidativer Stress und neuroinflammatorische Prozesse eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese des IPS spielen, wirken antiinflammatorische Präparate potentiell neuroprotektiv und stellen eine Möglichkeit zur Prävention des IPS dar. Tatsächlich zeigten epidemiologische Studien ein reduziertes IPS-Risiko bei Einnahme des Nichtsteroidealen Entzündungshemmers (engl. *non-steroidal anti-inflammatory drug*; NSAID) Ibuprofen (Chen et al. 2003). Weiterhin scheinen Ernährungs- und Lebensgewohnheiten einen Einfluss auf die initiale Pathogenese des IPS zu haben. Wachsendes Interesse gilt auch den vorteilhaften biologischen Eigenschaften pflanzlicher Inhaltsstoffe bei der Prävention des IPS. Dabei wird vor allem den Flavenoiden aufgrund ihren antiinflammatorischen und antioxidativen Eigenschaften und der Beeinflussung von Signalwegen eine neuroprotektive Wirkung zugesprochen (Hwang et al. 2012). Nach einer epidemiologischen Studie reduziert der Verzehr von flavenoidreichen Lebensmitteln das Risiko an einem IPS zu erkranken, deutlich (Gao et al. 2012). Flavenoide kommen in zahlreichen pflanzlichen Nahrungsmitteln in unterschiedlicher Zusammensetzung vor. So enthalten beispielsweise Äpfel, Beeren, dunkle Schokolade oder Soyaprodukte und Getränke wie Tee, Fruchtsäfte oder Rotwein Flavenoide mit unterschiedlichen biologischen Eigenschaften (Beecher 2015). Neben der natürlichen Aufnahme über die Nahrung können auch aus Pflanzen extrahierte Nahrungsergänzungsmittel eine Flavenoidquelle darstellen. Pycnogenol® (PYC) stellt einen solchen Pflanzenextrakt dar und soll im Folgenden näher vorgestellt werden.

1.7.1 Pycnogenol® (PYC)

PYC ist ein standardisierter Pflanzenextrakt aus der Rinde französischer Meereskiefern (*Pinus Pinaster* Subspezies *Atlantica villar*). Die Eigenschaften und Beschaffenheit von PYC sind im Arzneibuch der Vereinigten Staaten von Amerika, der *United States Pharmacopeia* (USP 28) spezifiziert. PYC wird in der Therapie verschiedener degenerativer Erkrankungen eingesetzt und zeichnet sich insbesondere durch sein antioxidatives Potential aus. Da die Qualität der

Kiefernrinde keinen jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen ist, kann PYC in weitgehend konstanter Zusammensetzung gewonnen werden.

Inhaltsstoffe

Die zur Gruppe der Flavenoide gehörenden oligomeren Proanthocyanidine (OPC) machen mit 65-75% den mittels *high-performance liquid chromatographic* (HPLC)-Analyse bestimmten größten Anteil von PYC aus (Rohdewald 2002). Flavenoide leiten sich aus den Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin ab und bestehen aus einem Phenylpropangerüst sowie einem zweiten aromatischen Ring, welcher aus drei Molekülen Malonyl-CoA gebildet wird und mit dem 9'-C-Atom des Phenylpropans verknüpft ist (Heldt & Piechulla 2015). Die OPC setzen sich aus den isomeren Flavan-3-ol Monomeren Catechin- und Epicatechin-Untereinheiten zusammen, welche meist durch C4-C8-Bindungen verbunden sind und größtenteils Di- oder Trimere bilden (siehe Abbildung 1). Weitere Inhaltsstoffe von PYC sind Polyphenol-Monomere, davon hauptsächlich Catechin und nur ein geringer Anteil an Epicatechin. Zudem ergibt sich ein gewisser Anteil an Taxifolin sowie Phenolsäuren wie Gallussäure, Kaffeesäure, Ferulsäure und Coumarinsäure, denen *in vitro* antibakterielle und antivirale Eigenschaften zugeschrieben werden. Die in PYC enthaltenen Komponenten sind in hohem Maße bioverfügbar und zeigen interessanterweise als Mischung eine bessere biologische Wirksamkeit als die Einzelkomponenten (D'Andrea 2010).

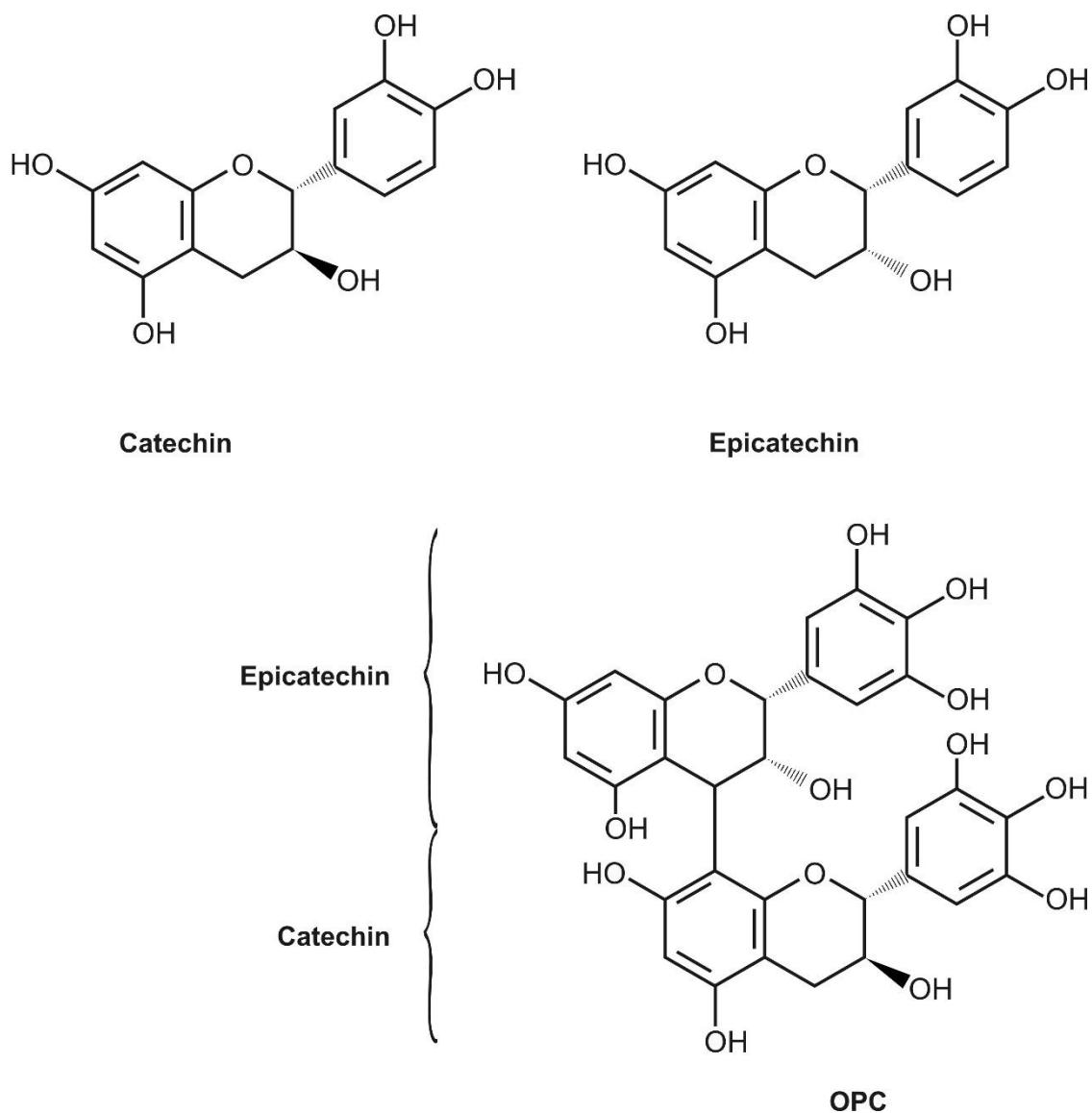


Abb. 1 Mögliche oligomere Anordnung der in PYC enthaltenen Flavan-3-ol-Monomere Catechin und Epicatechin zu oligomeren Proanthocyanidinen (OPC). OPC sind zumeist Dimere und Trimere von Catechin und Epicatechin (modifiziert und übernommen (D'Andrea 2010)).

Wirkungsweise und Anwendungsbereiche

Bedingt durch die aromatische Grundstruktur und das Vorhandensein von Hydroxylgruppen sind alle diese Komponenten in der Lage, freie Radikale wie radikalische Superoxidantien ($O_2^{\bullet-}$), Hydroxylradikale (HO^{\bullet}) oder nitrosative Sauerstoffspezies wie $^{\bullet}NO$ oder Peroxynitrit ($ONOO^{\bullet}$) durch Bildung mesomeriestabilsierter Phenoxyl-Radikale einzufangen (D'Andrea 2010). Aus dieser Eigenschaft leitet sich das antioxidative Potential von PYC ab. Es ist ein starkes Antioxidans, da es direkt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) reduziert. Zudem kann es durch seine Proteinbindungsfähigkeit indirekt in enzymatische Regulationsmechanismen eingreifen (Ezzikouri et al. 2015, Packer et al. 1999). PYC reduziert das Risiko für

kardiovaskuläre Erkrankungen, indem es die endotheliale Stickstoffmonooxidsynthetase (eNOS) aktiviert und somit zu einer gesteigerten NO-Synthese beiträgt. NO wirkt vasodilatatorisch und kann so die Durchblutung verbessern (Nishioka et al. 2007). Oftmals sind erhöhte Blutdruckwerte ursächlich für Endothelfunktionsstörungen. Durch die bereits erwähnte vasodilatatorische Aktivität von PYC konnten die systolischen und diastolischen Blutdruckwerte gesenkt werden. Besonders bei bestehender Medikation mit Antihypertensiva konnte PYC die blutdrucksenkende Wirkung verstärken und verbessert vermutlich die Durchblutung der Nieren (Cesarone et al. 2010). PYC senkt die Blutplättchenaktivität und reduziert so das Thromboserisiko (Golański et al. 2006, Pearson et al. 2002). Zudem konnte PYC die Blutglucose über eine Hemmung der α -Glucosidase senken (Schäfer & Högger 2007). Auch diabetische Mikroangiopathien und Folgeerkrankungen wie diabetische Retinopathie konnten mit PYC therapiert werden. Die Wirkung beruht hierbei maßgeblich auf einer Verbesserung der kapillären Durchblutung (Steigerwalt et al. 2009). Bei Koronararterienerkrankung konnte PYC zu einer Verbesserung der Endothelfunktion beitragen (Enseleit et al. 2012). PYC senkt den Venendruck und reduziert die Flüssigkeitsansammlung im Gewebe. Bei Langstreckenflügen zeigte PYC sogar eine bessere Wirkung als Kompressionsstrümpfe (Cesarone 2005). Eine weitere pharmakologische Eigenschaft von PYC ist die antiinflammatorische Wirkung. Zum Beispiel hemmt PYC Entzündungsmediatoren wie den Transkriptionsfaktor NF- κ B, welcher wiederum die Immunzellen veranlasst, weniger MMP-9 zu produzieren (Grimm et al. 2006). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass PYC die COX-1 und COX-2-Enzyme hemmt, was die antiinflammatorischen und antithrobotischen Effekte verstärkt (Schäfer et al. 2006). Anhand von *in-vivo* Untersuchungen im 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) induzierten Parkinson-Modell bei Mäusen konnte PYC die Aktivierung von NF- κ B und die mRNA-Menge von iNOS und COX-2 in den *Corpora striata* der Versuchstiere deutlich reduzieren und senkte die Freisetzung der Zytokine TNF- α und IL-1 β auf Proteinebene. Zudem reduzierte PYC den MPTP-induzierten oxidativen Stress. Diese Ergebnisse implizieren ein antiinflammatorisches und somit neuroprotektives Potential von PYC im MPTP-induzierten IPS-Modell (Khan et al. 2013).

1.8 Fragestellung

Basierend auf den in der Einleitung beschriebenen Überlegungen zur Beteiligung inflammatorischer und oxidativer Prozesse an der Pathogenese des IPS soll in dieser Arbeit das neuroprotektive Potential des Pflanzenstoffes PYC untersucht werden.

Anhand eines *in-vitro*-Modells (isolierte Mikroglia-Zellkultur) können proinflammatorische Mikrogliareaktionen mittels LPS induziert werden. Die Untersuchungen des Einflusses von PYC auf primäre Mikroglia erfolgen mit der Absicht auf weiterführende Erkenntnisse zu folgenden speziellen Fragestellungen:

- **Welchen Einfluss hat PYC auf die Zellviabilität?**
- **Welche phänotypische Merkmalsausprägung wird durch PYC in unstimulierten und LPS-aktivierten Mikrogliazellen hervorgerufen?**
- **Welchen Einfluss hat der Pflanzenextrakt PYC auf die LPS-induzierte mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine und entzündungsassoziierter Enzyme im zeitlichen Verlauf?**
- **Lässt sich auch auf Proteinebene ein Einfluss von PYC auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine feststellen?**
- **Welchen Einfluss hat PYC auf die NO-Produktion und die mRNA-Expression der iNOS?**
- **Ist PYC an der Regulation der MAPK-Signalwege beteiligt?**
- **Ist PYC in der Lage, die Mikroglia in ihrer Aktivität zu hemmen und die Neuroinflammation zu reduzieren?**
- **Stellt PYC eine mögliche Option zur Prävention des IPS dar?**

2. Material

Alle für diese Dissertation verwendeten Chemikalien und Reagenzien und deren Hersteller sind im Folgenden alphabetisch aufgelistet. Speziell herzustellende Lösungen, Medien und Puffer sowie Biochemische Kits, Enzyme, Primer und Antikörper werden nach Methoden geordnet aufgeführt. Für die Gewinnung primärer Mikroglia wurden Hirne von 1-3 Tage alten Ratten des Stammes *Sprague Dawley* eingesetzt. Die Tiere stammten aus dem Viktor-Hensen-Tierhaus der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und wurden unter Standardbedingungen gehalten. Die Arbeiten mit den Zellkulturen fanden unter einer sterilen Werkbank statt. Die Substanz Pycnogenol® (PYC) wurde freundlicherweise von *Horphag Research*, Genf, Schweiz, zur Durchführung dieser Studie zur Verfügung gestellt.

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Azeton	Merck, Darmstadt
Acryl-/Bisacrylamidlösung	Serva, Heidelberg
APS	Merck, Darmstadt
Aqua bidest (RNase frei)	Anatomisches Institut, Kiel
β-Glycerolphosphat	Sigma, Heidelberg
Bisbenzimid	Sigma, Heidelberg
Bromphenolblau	Rieder de Haen, Seelze
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, USA
BSA	Serva, Heidelberg
Chloroform	Sigma, Deisenhofen
Coomassie Blau	Serva, Heidelberg
DPBS (Ca ²⁺ und Mg ²⁺ - frei)	Pan Biotech, Aidenbach
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
DMF	Merck, Darmstadt
DTT	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
FKS	Invitrogen, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Merck Schuchard, Hohenbrunn

Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Glykogen	Sigma, Deisenhofen
Griess-Reagenz	Sigma, Deisenhofen
HCl	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES	Biomol, Hamburg
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Immu-Mount-Eindeckmedium	Thermo-Scientific, USA
Kasein (Magermichpulver)	Frema, Heimertingen
Kaisers-Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Pan Biotech, Aidenbach
LPS aus <i>Salmonella typhoricum</i>	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
MTT-Pulver	Sigma, Deisenhofen
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
Natrium- Vanadat	Sigma, Deisenhofen
Natrium- Pyrophosphat	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Pan Biotech, Aidenbach
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma, Deisenhofen
Protein Marker Pager Ruler™	Fermentas, St. Leon-Rot
PYC®	Horphag Research, Schweiz
Quiazol-Reagenz	Quiagen, Hamburg
SDS	Biomol, Hamburg
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS	Carl Roth, Karlsruhe
Trypanblau-Lösung (0,4%)	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
TWEEN 20	Carl Roth, Karlsruhe
Triton x-100	Sigma, Deisenhofen

2.2 anzusetzende Lösungen, Medien und Puffer

Isolierung und Kultivierung primärer Mikrogliazellen

Dissoziationslösung	0,024g	HEPES
	0,020g	Trypsin
	0,002g	EDTA
	35µl	DNase I (1mg/ml)
	ad 10 ml	DMEM
Kulturmedium Mikroglia	500ml	DMEM (4,5g Glucose/l)
	60 ml	FKS (bei 44-53°C inaktiviert)
	5ml	L-Glutamin (200mM)
	6ml	Penicillin (10.0000 U/ ml) und Streptomycin (10mg/ml) in PBS

Für die Kultivierung der Mikroglia wurde das FKS für 30 Minuten bei steigender Temperatur (44-53°C) inaktiviert. Für die Stimulationsansätze wurde das FKS 30 Minuten bei 56°C inaktiviert.

MTT-Test

MTT- Stammlösung (steril)	100 mg	MTT-Pulver
	20 ml	PBS
Solubilisierungslösung	210 ml	DMF- Lösung (50%ig)
	60 g	SDS
	7,5 ml	HCl
	7,5 ml	Essigsäure (80 %ig)

Coomassie-Färbung

Coomassie Blau-Lösung	1 g	Coomassie Blau
	450 ml	Methanol
	450 ml	Aqua bidest

Entfärbelösung für Coomassie-Färbung	450ml	Methanol
	100ml	Essigsäure
	450ml	Aqua bidest

ELISA

Waschpuffer (pH 7)	80g	NaCl
	11,6g	Na ₂ HPO ₄
	2,0g	KCl
	ad 10l	Aqua bidest
Assay Diluent	10% FKS in PBS	

Western-Blot-Analyse

Lysis-Puffer	100mM	NaCl
	50mM	TRIS
	5mM	EDTA
	1 %	Triton X-100
	2mM	Natrium-Vanadat
	2,5mM	Natrium-Pyrophosphat
	1mM	β-Glycerol-Phosphat
	1mM	Phenylmethylsulfonylfluorid

SDS-Probenpuffer (pH 8,0)	0,23g	SDS
	1,25ml	Sammelgelpuffer
	1ml	Glycin
	50mM	DTT
	ad 10ml	Aqua bidest

Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5M	TRIS
	0,4%	SDS
	ad 250ml	Aqua bidest

Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5M	TRIS HCl
	0,4%	SDS
	ad 250ml	Aqua bidest
Trenngel (10 %)	1,66 ml	Acryl-/Bisacrylamid-Lösung 30%
	1,3ml	Trenngelpuffer
	2,15ml	Aqua bidest
	30µl	APS (10% in Aqua bidest)
	15µl	TEMED
Sammelgel (4,5 %)	0,835ml	Acryl-/Bisacrylamid-Lösung 30%
	1,3ml	Sammelgelpuffer
	2,89 ml	Aqua bidest
	30µl	APS (10% in Aqua bidest)
	15µl	TEMED
Transferpuffer (pH 9,0) für 2,5l:	7,50g	TRIS
	36,0g	Glycin
	250 ml	Methanol
	ad 2,5l	Aqua bidest
TBST-Puffer (pH 7,5)	50mM	TRIS
	150mM	NaCl
	1mM	EDTA
	0,1 %	Tween
Laufpuffer/ Elektrodenpuffer (pH 8,2)	12,2g	TRIS
	57,6g	Glycin
	4g	SDS
	ad 4,01l	Aqua bidest

2. 3 Biochemische Kits, Enzyme und Primer

Reverse Transkription

DNase-Kit: Promega, USA

RQ1 RNase-freie DNase

RQ1 RNase-freie DNase 10x Reaktionspuffer

RQ1 Stopplösung (25mM EDTA)

cDNA-Synthese:

Random Hexamer Primer Thermo Scientific, USA

Desoxynukleotid-Set 5Prime, Hamburg

Zur Herstellung von dNTPMix (10mM)

RevertAcid™H Minus Reverse Transkriptase Thermo Scientific, USA
mit 5xReaktionspuffer

Real-Time PCR

TaqMan® (Thermus aquaticus) Universal PCR Applied Biosystems, USA
Master- Mix

TaqMan®-Assay on Demand mit (ID; life technologies, USA)
fluoreszenzmarkierten

Oligonukleotidsonden zur Bestimmung der
Genexpression von:

iNOS	Rn00563409_m1
IL-1β	Rn00580432_m1
IL-6	Rn00561420_m1
TNF-α	Rn99999017_m1
COX-2	Rn00568225_m1
MMP-9	Rn00579162_m1
Eukaryotische18s-rRNA (housekeeping gene)	Hs99999901_s1

Western-Blot-Analyse

Detektionsreagenz Immobilon™Western mit: Merck Millipore, USA

Luminol-Reagenz und

Peroxid-Lösung

ELISA

BD OptEIA™Set für Ratten-TNF-α , BD-Biosciences, USA

OptEIA™Set für Ratten- IL-6

Jeweils mit:

Fangantikörper,

Detektionsantikörper,

Enzymreagenz Sav-HRP,

Proteinstandard (für TNF-α bzw. IL-6)

TMB Substrat Kit 1:1 aus

Thermo-Scientific, USA

Peroxidase-Lösung und

Peroxidase-Substrat

Stopplösung 2N H₂SO₄

Carl Roth, Karlsruhe

2.4 Antikörper

Western-Blot

Primäre Antikörper

Phospho-p44/42 MAPK (ERK 1/2)-Antikörper Cell Signaling Technology, USA
(T202/T204); (1:1000)

MAP Kinase 2/ERK2-Antikörper (clone Merck Millipore, USA
1B3B9);
(1:500)

Phospho-p38MAPK-Antikörper Cell Signalling Technology, USA
(Thr180/Tyr182)(D3F9)XP®; (1:1000)

p38 MAPK Antikörper Cell Signalling Technology, USA
(1:1000)

Sekundäre Antikörper

Ziegen-anti-Kaninchen IgG- HRP gekoppelter Santa Cruz, USA

Antikörper (sc-2004);

(1:30000)

Ziegen-anti-Maus IgG- HRP gekoppelter Santa Cruz, USA

Antikörper (sc-2031);

(1:30000)

2.5 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser (2,6 x 2,6 cm)	Carl Roth, Karlsruhe
6-Well-Mikrotiterplatten	Sarstedt, Nürnberg
12-Well Mikrotiterplatten	Sarstedt, Nürnberg
96-Well Mikrotiterplatten	Sarstedt, Nürnberg
96-Well Mikrotiterplatten für ELISA	Sarstedt, Nürnberg
Gewebekulturschälchen (60 x 15 mm)	Sarstedt, Nürnberg
Multiply Reaktionsgefäße (150 µl)	Sarstedt, Nürnberg
Multiply 96-Well qPCR-Platte	Sarstedt, Nürnberg
Objektträger SuperFrost Plus	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen, diverse Größen	Sarstedt, Nürnberg
PVDF- Membran "Hybond P"	GE Healthcare, UK
Pasteurpipetten	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße (1,5ml, 50ml)	Sarstedt, Nürnberg
Whatman-Pappe	GE Healthcare, UK
75m ² -Zellkulturflaschen mit Filterdeckel	Sarstedt, Nürnberg
Zellschaber (steril)	Sarstedt, Nürnberg
Zentrifugenröhrchen (10ml, 50ml)	Sarstedt, Nürnberg

2.6 Geräte und Apparaturen

ABI Prism TM -Sequence Detection System 7000	Applied Biosystems, USA
Binokular STEMI SV8	Carl Zeiss, Göttingen
Blot-Kammer Trans-Blot® SD Cell	Bio-rad, USA
Brutschrank HERAccl	Heraeus, Hanau
Chemilumineszenzdetektor Fusion SL	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss, Göttingen
Fluoreszenzmessgerät GENios Reader	Tecan, Österreich
Fotokamera Axioacam	Carl Zeiss, Göttingen
Gefrierschrank-, Kühlschrank	Privileg, Hamburg
Gefrierschrank (-70°C)	Heraeus, Hanau
Gelgießstand	Bio-rad, USA
Gelelektrophoresekammer Power Pack ²⁰⁰	Bio-rad, USA
Lichtmikroskop	Wilovort, Wetzlar
Neubauer Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe
Mikrotiterplatten-Photometer SLT-Reader	SLA Laborinstrumente, Karlsheim
Photomikroskop Axiophot	Carl Zeiss, Göttingen
Pipetten (1-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Rotationsschüttler Typ RO 01	Gerhard, Bonn
Spektral-Photometer Epoch2	Biotek, Bad Friedrichshall
Sterile Werkbank HERASafe®	Heraeus, Hanau
Thermocycler GenAMP®-PCR System 2400	Applied Biosystems, USA
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Vortex- Genie 2	Scientific Industries, USA
Waage BP 610	Sartorius AG Göttingen
Wasserbad	Köttermann, Uetze/ Hänigsen
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg

2.7 Computersoftware

mRNA-Messung: Gen5™

Real-time PCR: ABI Prism 7000 SDS

Western-Blot: Fusion-SL

Photomikroskopie: Axiovision 4.7

Statistik: Prism 5 (Version 5.04)

Microsoft EXCEL 2010

Biotek®, Bad Friedrichshall

Applied Biosystems, USA

Vilber Lourmat, Eberhardzell

Carl Zeiss, Göttingen

GraphPad, USA

Microsoft® Corporation, USA

3. Methoden

3.1 Isolierung und Kultivierung primärer Mikroglia

Die Gewinnung der Mikroglia erfolgte aus neugeborenen Ratten (P1-P3) des Stammes *Sprague Dawley* nach der modifizierten Standardmethode nach McCarthy und de Vellis (1980). Zunächst wurden die Tiere mittels Skalpell dekapitiert, die Gehirne nach vorsichtigem Eröffnen der Schädelkalotten stumpf entnommen und in Gewebekulturschälchen mit DPBS (supplementiert mit 1% Penicillin/Streptomycin) gesammelt und gewaschen. Unter dem Binokular wurden die Meningen von den Gehirnkortizes entfernt und anschließend *Cerebellum*, *Diencephalon*, *Hippocampus* sowie *Bulbi olfactorii* von jedem Gehirn abgetrennt. Je 4-5 der verbliebenen Kortexhälften und bis zu 6 Mesenzephalien wurden in separaten Gewebekulturschälchen mit je 3ml DPBS gesammelt und gewaschen. Unter einer sterilen Werkbank wurden die Kortizes und Mesenzephalien anschließend mittels Skalpell weiter zerkleinert und die Gewebestücke in separate 10ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Dann erfolgte die enzymatische Dissoziation durch eine 30-minütige Inkubation mit 3ml Dissoziationslösung mit 35µl DNase im Brutschrank bei 37°C und 8,3% CO₂-Begasung. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und verworfen, die Trypsinaktivität durch Zugabe von 2ml FKS-haltigem Zellkulturmedium gestoppt und die dissoziierten Gewebe mit Hilfe einer thermisch verengten Pasteurpipette mehrmals resuspendiert. Auf diese Weise wurden die Zellen weiter vereinzelt. Die Zellsuspensionen von Mesenzephalien und Kortizes wurden in 50ml-Zentrifugenröhrchen separat gesammelt und die Zellen von je etwa 2 Kortexhälften bzw. 2 Mesenzephalien wurden in 10ml Kulturmedium gegeben, in 75cm²-Zellkulturflaschen überführt und 9-10 Tage bei 37°C und 8,4% CO₂-Begasung im Brutschrank inkubiert. Alle 48 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, bis der Zellrasen konfluent gewachsen war. Dann erfolgte die Isolierung der frei flottierenden Mikroglia vom Zellrasen durch manuelles Schütteln der 75 cm²-Zellkulturflaschen. Die die Mikroglia enthaltenden Zellkulturüberstände wurden in 50ml-Zentrifugenröhrchen dekantiert. Anschließend erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 500 x g. Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets in dem verbliebenen Restmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen aus Kortizes bzw. Mesenzephalien in einem 50ml-Zentrifugenröhrchen vereinigt und die Zellzahl durch Auszählen bestimmt. Dazu wurden 10µl der Zellsuspension mit 10µl Trypanblau-Lösung gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer mikroskopisch die vitalen Zellen ausgezählt. Trypanblau ist

als hochmolekularer Farbstoff nicht membrangängig und färbt daher nur avitale Zellen blau an. Demzufolge wurden die hellen Zellen als vital identifiziert.

Versuchsansätze:

Für die Versuche wurden die isolierten Mikrogliazellen folgendermaßen ausgesät:

- je 100.000 in 96-Well-Mikrotiterplatten für MTT-Test,
- je 100.000 auf Deckgläsern für Coomassie-Färbung,
- je 1 Million in 12-Well-Mikrotiterplatten für Real-Time PCR und ELISA,
- je 1 Million in 12-Well-Mikrotiterplatten für Western-Blot-Analyse (Gesamtprotein)

Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C und 8,4% CO₂-Begasung im Brutschrank wurden die Überstände verworfen und das jeweilige Stimulationsreagenz hinzugegeben. Um die Mikrogliazellen zu aktivieren, erfolgte eine Stimulation mit LPS. Den Versuchsansätzen wurden folgende Stimulationsreagenzien mit je 1ml Kulturmedium zugesetzt (bei 96-Well-Mikrotiterplatten wurden je 100µl Kulturmedium zugesetzt):

- 1) 1ml Kulturmedium als Kontrolle
- 2) LPS [5ng/ml] in 1ml Kulturmedium
- 3) PYC [25µg/ml] in 1ml Kulturmedium
- 4) PYC [25µg/ml] und LPS [5ng/ml] in 1ml Kulturmedium

Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C und 8,4% CO₂-Begasung, wobei sich der Stimulationszeitraum nach der jeweiligen Fragestellung richtete. So wurde der MTT-Test im Zellkulturüberstand 24 Stunden nach Stimulation gemessen. Für die Coomassie-Färbung wurden die Zellen 48 Stunden inkubiert. Die Isolierung der Gesamt-RNA für die qPCR erfolgte nach 3, 6 und 24 Stunden. Der bei den entsprechenden Versuchen abgenommene Zellkulturüberstand diente dem Proteinnachweis von TNF-α und IL-6 mittels ELISA. Die indirekte Messung der NO-Freisetzung in den Zellkulturüberstand erfolgte nach 6 und 24 Stunden. Für die Western-Blot-Analyse betrug die Stimulationszeit 10 Minuten.

3.2 Untersuchungen zum Einfluss von Pycnogenol® auf Mikrogliazellen

3.2.1 MTT-Test

Der MTT-Test ermöglicht die Bestimmung des Anteils an vitalen Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Das wasserlösliche gelbe Substrat MTT wird durch mitochondriale Succinatdehydrogenasen sowie Enzyme des endoplasmatischen Retikulums zu wasserunlöslichem, violetten Formazan reduziert. Da diese Enzyme nur in vitalen Zellen aktiv sind, steht die Menge an gebildetem Formazan als Maß für den Anteil vitaler Zellen. Daher dient der MTT-Test zum einen als Zytotoxizitätstest und zum anderen spricht eine gesteigerte Formazan-Bildung für eine Zellproliferation.

Die Mikrogliazellen wurden geerntet und ihre Zellzahl wie in 3.1 beschrieben bestimmt. Mittels einer Mehrkanalpipette wurden je 100.000 Mikrogliazellen in 200µl Medium pro Well in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Zellen wuchsen für 24 Stunden im Brutschrank an, bevor die Inkubation der Mikroglia mit den Stimulationsansätzen in je 100µl Kulturmedium erfolgte (3.1). Die äußeren Wells enthielten keine Zellen und es wurde ausschließlich Kulturmedium ohne Stimulationsreagenz hinzugegeben; sie dienten als Leerwerte, gegen welche später abgeglichen wurde.

Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 8,4% CO₂-Begasung, wurde das Stimulationsmedium entfernt, wobei je 100µl davon zur späteren NO-Messung dienten. Anschließend wurden in jedes Well je 100µl Kulturmedium sowie 25µl MTT-Stammlösung pipettiert und für weitere 2 Stunden im Brutschrank inkubiert, sodass es zur Bildung von Formazankristallen kam. Im nächsten Schritt wurde mittels Mehrkanalpipette je 100µl Solubilisierungslösung zu den Versuchsansätzen pipettiert, um die Formazankristalle zu lösen. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 1,5 Stunden im Brutschrank wurden die Proben mittels Rührstäbchen umgerührt und anschließend die Absorption des gelösten Formazans bei einer Wellenlänge von 550nm (Referenz: 620nm) gegen die Leerwerte im Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

3.2.2 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung diente der Untersuchung der morphologischen Veränderungen der Mikrogliazellen. Zunächst erfolgte die Aussaat der Mikroglia auf Deckgläsern in 6-Well-Mikrotiterplatten und eine 24-stündige Inkubation in 1ml Kulturmedium. Anschließend folgte eine 48-stündige Inkubation der Mikroglia mit den Stimulationsreagenzien (3.1). Dann

wurden die Zellen auf den Deckgläsern dreimal mit DPBS gewaschen. Die Zellfixierung erfolgte für 40 Minuten mit 1ml Glutaraldehyd (2,5%). Die Deckgläser wurden erneut dreimal mit DPBS gewaschen und für 40 Minuten mit der Coomassie Blau-Lösung behandelt. Überschüssige Farbstofflösung wurde mehrmals mit je 1ml der Entfärbelösung und anschließend mit *Aqua bidest* abgespült und die Deckgläser mit Kaisers-Glyceringelatine auf Objektträgern eingedeckt. Die Auswertung der Zellmorphologie erfolgte mit dem Photomikroskop.

3.2.3 Isolierung der Gesamt-RNA

Um die zelluläre Gesamt-RNA aus den Mikrogliazellen zu isolieren, kam die sogenannte Einschritt-Flüssigphasen-Separation mittels Quiazol-Reagenz zur Anwendung. Durch das in Quiazol enthaltene chaotrope Salz Guanidinthiocyanat kommt es zur Zelllyse. Gleichzeitig werden RNAsen und andere Enzyme inaktiviert, wodurch sich eine stabile Gesamt-RNA ergibt. DNA und Proteine lösen sich gut in Phenol, einem weiteren Bestandteil des Quiazol-Reagenz. Durch die unterschiedlichen Löslichkeiten ergibt sich eine zweiphasige Emulsion, was eine Isolierung der Gesamt-RNA ermöglicht.

Zunächst wurden die Zellkulturüberstände der Versuchsansätze aus den 12-Well-Mikrotiterplatten (3.1) entfernt und die Mikroglia anschließend zweimal mit DPBS gewaschen. Durch Zugabe von Quiazol-Reagenz erfolgte eine Zelllyse. Zusätzlich wurden die Zellen mechanisch mithilfe eines sterilen Zellschabers vom Boden der Mikrotiterplatten abgelöst und anschließend in 1,5ml-Reaktionsgefäße abgefüllt. Zu den Zelllysaten wurden je 200µl Chloroform gegeben und die Reaktionsgefäße für 15 Sekunden geschüttelt. Nach 2-3 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation bei 12.000 x g und 2-8°C ergab sich folgende Phasentrennung:

- eine obere wässrige Phase mit der darin gelösten RNA,
- eine hauptsächlich aus DNA bestehende wässrige Interphase
- eine Phenol-Chloroform-Phase mit DNA und Protein.

Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und jeweils in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Zugabe von je 1µl Glykogen (sterile Lösung 10mg/ml in *Aqua bidest*) wurde die RNA mit je 500µl Isopropanol präzipitiert, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 2-8°C für 10 Minuten bei 12.000 x g zentrifugiert. Es

setzte sich ein gelartiges RNA-Pellet am Boden und am Rand des Reaktionsgefäßes ab. Nach Abnahme des Überstandes wurde 1ml Ethanol (78%) zugegeben und das RNA-Pellet darin gewaschen. Nach einer anschließenden fünfminütigen Zentrifugation bei 7.500 x g und 2-8°C setzte sich die mRNA am Boden des Reaktionsgefäßes ab. Nach Entfernen des Überstandes wurde die RNA in 30-50µl RNase-freiem *Aqua bidest* gelöst und anschließend für 10 Minuten bei 57°C inkubiert. Die so isolierte mRNA konnte nun direkt für weitere Experimente verwendet, oder bei -70°C gelagert werden. Die Bestimmung der mRNA-Konzentration erfolgte im Spektral-Photometer bei einer Wellenlänge von 550nm (Referenz 620nm).

3.2.4 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird, ausgehend von der isolierten mRNA, eine komplementäre cDNA synthetisiert, welche im Zuge der qPCR vervielfältigt wird. Vor der eigentlichen cDNA-Synthese sollte die zu Grunde liegende mRNA, besonders bei Verwendung für die qPCR, frei von DNA-Kontamination sein. Die DNA-Elimination erfolgte mittels DNA-Verdau nach Anleitung eines DNase-Kits.

Der Reaktionsansatz lautete wie folgt:

Probe (1 µg mRNA in 8µl <i>Aqua bidest</i>)	→ 8µl
RQ1 RNase-freier DNase 10x Reaktionspuffer	→ 1µl
RQ1 RNase freie DNase (1µl pro µg RNA)	→ 1µl

Es erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei 37°C im Thermocycler. Zur Beendigung des DNA-Verdaus wurde je 1µl RQ1 DNase Stopplösung (25mM EDTA) zu den Proben pipettiert und für 10 Minuten bei 65°C inkubiert, um die DNasen zu inaktivieren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben auf Eis gestellt. Die cDNA-Synthese erfolgte nach Anleitung eines cDNA-Synthese-Kits:

Zunächst wurde 1µl Random Hexamer Primer, bestehend aus 6 zufällig zusammengesetzten Nukleotiden, zu den Proben pipettiert. Während einer Inkubationszeit von 5 Minuten im Thermocycler bei 70°C erfolgte die Hybridisierung der Primer an die komplementären Sequenzen der mRNA. Im Anschluss wurde den Versuchsansätzen eine Mischung aus je 4µl 5x Reaktionspuffer, 2µl dNTPMix sowie 1µl *Aqua bidest* zugegeben. Nach fünfminütiger Vortemperierung bei 25°C im Thermocycler, erfolgte die Zugabe von je 1µl Reverser Transkriptase, welche im Gerät eingerührt wurde. Die cDNA-Synthese erfolgte für 10

Minuten bei 25°C und weitere 60 Minuten bei 42°C. Durch Erhitzen auf 70°C für 5 Minuten wurde die Reaktion beendet. Die mittels Reverser Transkription erhaltene cDNA konnte nun direkt für die qPCR verwendet oder bei -20°C für mehrere Wochen gelagert werden.

3.2.5 Quantitative Real-time PCR (qPCR)

Die quantitative Real-time PCR (qPCR) dient der Vervielfältigung sowie der Quantifizierung von Nucleinsäuren in Echtzeit. Auf diese Weise lässt sich die Expression ausgewählter Gene in den Stimulations- und Kontrollansätzen miteinander vergleichen und quantifizieren.

In dieser Dissertation diente die mittels Reverser Transkription gewonnene cDNA als Ausgangssubstanz für die qPCR. Um die qPCR-Produkte während der Reaktion zu markieren, kam das TaqMan[®]-System zum Einsatz: Neben den spezifischen Primern der eigentlichen qPCR wurden den Reaktionsansätzen fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid-Sonden (TaqMan[®] *Assay on Demand*) hinzugegeben. Diese hybridisieren an die cDNA und werden während der Synthese des Zweitstranges durch die 5'-3'-Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase hydrolytisch gespalten, was zur Emission einer Fluoreszenz führt. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist dabei direkt proportional zur Anzahl der neugebildeten DNA-Stränge und somit zur Menge der Ausgangs-DNA. Durch Vergleich des C_T-Wertes (PCR-Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrund abhebt) mit den C_T-Werten eines endogenen Standards (*housekeeping gene*; 18s-rRNA), wurde die Expression der unterschiedlichen Zielgene quantifiziert.

Für die qPCR wurden je 4µl pro cDNA-Probe (Verdünnung 1:20 in *Aqua bideist*) in Doppelansätzen auf eine *Multiply* 96-Well qPCR-Platte pipettiert. Zu den Proben wurde qPCR *Master-Mix*, bestehend aus 10µl TaqMan[®] *Universal Master Mix*, 1µl TaqMan[®] *Assay on Demand* sowie 5µl RNase-freiem *Aqua bideist*, pipettiert. Die qPCR erfolgte mittels *ABI Prism™ Sequence Detection System 7000*. Zunächst wurden die Proben für 15 Sekunden auf 94°C erhitzt um eine Denaturierung der doppelsträngigen cDNA zu erreichen. Im zweiten Schritt wurde die Temperatur auf 60°C reduziert um eine Rückbildung der Doppelhelix zu vermeiden und die Hybridisierung der spezifischen Primer an die komplementäre cDNA zu ermöglichen (*annealing*). Im letzten Schritt erfolgt die Elongation. Zu diesem Zweck wurde die Temperatur auf 72°C, das Arbeitsoptimum der Taq-Polymerase, erhöht. Diese vervollständigte dann ausgehend von den spezifisch gebundenen Primern die cDNA-Einzelstränge zu Doppelsträngen. In diesem Fall fanden 40 Zyklen statt. Das *ABI Prism™*

Detection-System 7000 ist in der Lage, die während der PCR-Zyklen ausgesendeten Fluoreszenzsignale zu detektieren und mittels *ABI Prism™7000 SDS- Software* auszuwerten.

3.2.6 Indirekte Stickstoffmonoxidmessung mittels Griess-Reagenz

Da aktive Mikrogliazellen Stickstoffmonoxid (NO) freisetzen, kann dieses als Indikator für deren Aktivierungsgrad dienen. NO ist ein stark flüchtiges Gas und kann daher nur indirekt über die Bildung von Nitrit gemessen werden. Nach einer Stimulationszeit von 6 und 24 Stunden wurden je 100µl der Kulturüberstände aus den Versuchsansätzen (3.1) abgenommen und mit je 100µl Griess-Reagenz in einer 96-Well Mikrotiterplatte gemischt. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nitrit (NO_2^-) reagiert mit Sulfanilamid, einer Komponente des Griess-Reagenz zu einem Komplex. Dieser Komplex reagiert mit dem ebenfalls im Griess-Reagenz enthaltenen Naphtylethylendiamin zu einem violetten Diazofarbstoff. Dessen Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 550nm (Referenz: 620nm) im Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

3.2.7 ELISA zum Nachweis von IL-6 und TNF- α

Nachdem der Einfluss von PYC auf die mRNA Expression proinflammatorischer Zytokine und Enzyme mittels qPCR analysiert worden war, erfolgte der Nachweis von IL-6 und TNF- α auf Proteinebene mittels des enzymgekoppelten Immuno-Adsorptionstests ELISA (*enzyme-linked-immunosorbent-assay*). Hierzu wurden entsprechende TNF- α bzw. IL-6- Antikörpersets in Form einer Sandwich-ELISA nach Herstellerangaben eingesetzt. Zunächst wurden je 100 µl des jeweiligen primären Fangantikörpers (anti-IL-6; 1:125 verdünnt oder anti-TNF- α ; 1:250 verdünnt in DPBS) in die Vertiefungen einer 96-Well Mikrotiterplatte für ELISA pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Vertiefungen 5 mal mit Waschpuffer gewaschen um die überschüssigen Antikörper zu entfernen und anschließend mit 200µl *Assay Diluent* für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um die unspezifischen Antikörperbindungsstellen abzusättigen. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit Waschpuffer. Anschließend wurden je 100µl der Zellkulturüberstände (3.1) mit *Assay Diluent* im Verhältnis 1:40 für LPS-enthaltende Proben und 1:2 für alle nicht LPS-enthaltenden Proben für den IL-6-ELISA verdünnt. Alle Proben für den TNF- α ELISA wurden 1:2 verdünnt. Je 100µl der Proben wurden in jede Vertiefung pipettiert. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur für den TNF- α -ELISA und für den IL-6-ELISA bei 37°C in welcher sich die Bindung an den Fangantikörper vollzog. Anschließend folgte ein weiterer

fünfmaliger Waschschrift mit Waschpuffer. Im nächsten Schritt wurden je 100µl eines im Verhältnis 1:250 in DPBS verdünnter Biotin-gekoppelter Detektionsantikörper in die Vertiefungen pipettiert und bei Raumtemperatur (IL-6) bzw. 37°C (TNF-α) für 60 Minuten inkubiert. Durch anschließendes dreimaliges Waschen mit Waschpuffer wurde überschüssiger Detektionsantikörper entfernt. Im nächsten Schritt wurden je 100µl des Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Enzymreagenz (Sav-HRP; 1:250 in *Assay Diluent*) in jede Vertiefung der Platte pipettiert und diese für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Sav-HRP bindet mit hoher Affinität an das Biotin des Detektionsantikörpers. Nach erneutem fünfmaligem Waschen mit Waschpuffer wurden je 100µl TMB-Substrat mit TMB-Lösung aus dem TMB Substrat Kit im Verhältnis 1:1 in die Vertiefungen der Platte pipettiert. Es kommt zu einer durch das Sav-HRP katalysierten Enzym-Substrat-Reaktion, verbunden mit der Bildung eines blauen Farbstoffs. Diese Reaktion wurde nach 10 Minuten durch Zugabe einer Stopplösung beendet. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmessgerät bei 450nm Wellenlänge (Referenz: 570 nm).

3.2.8 Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse ist ein molekularbiologisches Verfahren zum spezifischen Nachweis von Proteinen. Nach Auftrennung des Proteingemisches erfolgt die Übertragung (*blotting*) auf eine Trägermembran. In dieser Arbeit wurde mittels Western-Blot-Analyse der Einfluss von PYC auf die Expression der extrazellulär regulierten Kinasen (EKR) und der p38-Kinasen, welche zur Gruppe der mitogen aktivierten Kinasen (MAPK) gehören, untersucht. Es handelt sich hierbei um Serin/Threonin-Kinasen, welche durch Phosphorylierung aktiviert werden und Bestandteil zahlreicher Signaltransduktionswege sind. Zunächst werden die Proteine eines Proteingemisches mit Hilfe des Gelelektrophorese-Verfahrens SDS-PAGE in einem Trärgel entsprechend ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld aufgetrennt. Durch das negativ geladene Detergenz SDS wird die Eigenladung der Proteine maskiert, sodass diese gemäß ihres Molekulargewichtes in Banden angeordnet werden. Die so nach Größe sortierten Proteine können nun mittels Immundetektion sichtbar gemacht werden. Hierzu werden die Proteine im Gel zunächst auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran transferiert. Die Identifizierung der Proteinbanden auf der Membran erfolgt mit Hilfe spezifischer Antikörper. Ein antigenspezifischer Primärantikörper bindet an das Epitop auf dem räumlich von den anderen Proteinen getrennten Antigen mit einer charakteristischen Molmasse. An die Fc-Region des primären Antikörpers bindet ein

sekundärer HRP (*horseradish peroxidase*= Meerrettichperoxidase)-gekoppelter Antikörper als Immunkonjugat. Die HRP katalysiert die Oxidation von Luminol, wobei eine Lumineszenz freigesetzt wird, welche wiederum detektiert werden kann.

Gewinnung des Gesamtproteins. Zunächst wurde das Kulturmedium aus den Ansätzen (3.1) entfernt. Es folgte ein zweimaliger Waschschrift der 12-Well-Mikrotiterplatten mit kaltem DPBS. Anschließend wurden je 100µl Lysispuffer hinzugegeben und die Mikroglia zusätzlich mit einem sterilen Zellschaber mechanisch vom Boden der Vertiefungen abgelöst. Die Zelllysate wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren homogenisiert, in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt und die Proteinmenge bestimmt. Hierzu wurden 12,5µl der Probe mit 12,5µl DPBS in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß verdünnt und davon je 10µl mit 200µl *Bio-Rad-Protein-Assay* pro Vertiefung in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 540nm mit dem Fluoreszenzmessgerät photometrisch gemessen und die Proteinmenge anhand einer mitgeführten BSA-Standardreihe quantifiziert. Dementsprechend wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer verdünnt, sodass sich eine definierte Proteinkonzentration von 5µg/ml ergab.

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Proben wurden 5 Minuten bei 99°C denaturiert. Dann folgte die gelelektrophoretische Trennung mittels SDS-PAGE, einer Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einem Tris HCL-Puffersystem. Das Trenngel wurde mit einem Polyacrylamidgehalt von 10% angesetzt, um eine optimale Trennschärfe zu erreichen. Im Sammelgel betrug der Polyacrylamidgehalt 4,5%. Die Herstellung der Gele erfolgte in einem Gelgießstand. Die Polymerisationszeit betrug jeweils 15 Minuten. Nach Abschluss der Polymerisation wurden die Gelplatten in eine Gelelektrophoresekammer eingesetzt. In die Sammelgel-Taschen wurden die zu untersuchenden Proteinproben (5µg/ml mit Bromphenolblau) pipettiert. Zur Größenbestimmung der Proteine bei der Gelelektrophorese ein Proteinstandard mitgeführt. Dieser bestand aus 10 rekombinanten Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 10 und 170kD. Die enthaltenen Proteine wurden in Laufpuffer in der Gelelektrophoresekammer bei einer Stromstärke von 340mA und einer Spannung von 200V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte so lange, bis der Bromphenolblau-Lauffrontanzeiger, das untere Ende des Trenngels erreicht hatte (etwa 45-60 Minuten).

Elektrophoretischer Proteintransfer (*blotting*) mittels *semi-dry*-Verfahren. Die in dem SDS-Gel enthaltenen Proteine wurden mittels *semi-dry*-Verfahren in einer Blot-Kammer auf eine spezielle proteinbindende PVDF-Membran transferiert. Dazu wurde die Membran in Größe des Trenngels etwa 1 Minute in reinem Methanol aktiviert und anschließend 15 Minuten in Transferpuffer gelagert. Auf die mit Transferpuffer angefeuchtete Kathodenplatte wurden 2 in Transferpuffer eingeweichte Whatman-Pappen aufgelegt. In der Schichtungsfolge Richtung Kathode folgte die PVDV-Membran, darauf das SDS-Gel, welches zuvor vorsichtig aus dem Gießstand entnommen wurde. Zum Schluss wurden wieder 2 in Transferpuffer eingelegte Whatman-Pappen aufgeschichtet, die Luftblasen entfernt und die Kathodenplatte als Deckel aufgelegt. Der Proteintransfer erfolgte senkrecht zu dem von Filterpapier eingerahmten SDS-Gel und der PVDV-Membran, entlang eines elektrischen Feldes in Richtung Anode bei 25V und 1A für 30 Minuten.

Immunodetektion. Nach Ablauf des Laufprogramms wurden die freien Bindungsstellen der PVDV-Membran durch einstündige Inkubation in einer 2% Kasein-TBST-Lösung (2% Magermilchpulver in TBST Puffer) geblockt. Es erfolgte die Proteindetektion durch Bindung von Erst- und Zweitantikörper. Als Primärantikörper wurden Phospho-p44/42 MAPK und MAPK 2/ERK2-Antikörper oder Phospho-p38 MAPK und p38 MAPK-Antikörper verwendet. Nach Entfernen des Blockierungspuffers und reichlichem Waschen mit TBST, wurden 5ml der Erstantikörperlösung 1:1000 (phospho-p44/42 MAPK) oder 1:500 (Anti MAP Kinase 2/ERK2-Antikörper) sowie 1:1000 (phospho-p38MAPK und p38 MAPK-Antikörper) verdünnt in 2% Kasein-TBST-Lösung auf die PVDV-Membran gegeben und in ein 50ml-Reaktionsgefäß gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Entfernen der überschüssigen Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit TBST-Puffer, wurde die Membran mit 20ml von dem HRP-konjugierten IgG-Sekundärantikörper behandelt (1:30000 in 2% Kasein-haltigem TBST-Puffer) und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abermaligem Waschen (dreimalig mit TBST-Puffer), erfolgte ein Proteinnachweis durch Chemilumineszenz. Zu diesem Zwecke wurden zunächst 300µl des Detektionsreagenz *Immobilon™ Western*, bestehend aus Luminol-Reagenz und Peroxid-Lösung welche im Verhältnis 1:1 gemischt wurden für 2 Minuten bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Es kam zu einer durch die HRP katalysierten Oxidation des im Luminol-Reagenz enthaltenen cyclischen

Diacylhydrats Luminol durch das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) aus der Peroxid-Lösung. Die Reaktion wurde zusätzlich durch im Luminol-Reagenz enthaltene Verstärkersubstanzen angeregt und es entwickelte sich eine Chemilumineszenz. Die Membran wurde in Klarsichtfolie eingeschlagen und mittels Chemilumineszenzdetektor wurden die Banden auf den Membranen dargestellt. Zum eindeutigen Nachweis von ERK2, pERK1/2, p38 und Pp38 sowie zur Kontrolle der Proteinübertragung auf die PVDV-Membran, wurde diese „gestrippt“. *Stripping* (engl. abziehen) bezeichnet das Ablösen von Primär- und Sekundärantikörpern von der Membran, welche anschließend erneut mit Antikörpern beschickt wird. Zu diesem Zwecke wurde die Membran dreimal 5 Minuten mit 0,1M Glycin und anschließend für dreimal 5 Minuten mit 0,1M TRIS gewaschen. Danach wurde die Membran mit Kasein (2% in TBST-Puffer) geblockt und erneut über Nacht mit Primärantikörper inkubiert. Hier konnten erneut die primären Antikörper in ursprünglicher oder erhöhter Konzentration verwendet werden. Weiterhin wurde die Membran wie oben beschrieben mit HRP-konjugierten Sekundärantikörpern beschickt und die Proteine durch Chemilumineszenz nachgewiesen.

4. Ergebnisse

4.1 PYC steigert die Zellviabilität primärer Mikroglia

Der MTT-Test ermöglicht die Bestimmung des Anteils vitaler Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle, der sogenannten Zellviabilität. Eine Reduktion des nur in vitalen Zellen gebildeten Formazan lässt auf eine Zytotoxizität schließen, wogegen ein Anstieg für eine Proliferation spricht. Die Bestimmung der Formazan-Bildungsrate in den Stimulationsansätzen (Kontrolle, LPS [5ng/ml], PYC in aufsteigender Konzentration [10µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml; 100µg/ml], PYC in der jeweiligen Konzentration + LPS) erfolgte nach Zugabe von MTT und Solubilisierung der Mikroglia im Mikrotiterplattenphotometer und ist in Abbildung 2a graphisch dargestellt. Die Stimulationszeit betrug 24 Stunden. Die Messwerte sind als Relativwerte (in %) der unstimulierten Mikroglia (Kontrolle) angegeben. Bei Stimulation mit LPS zeigt sich keine signifikante Veränderung der Formazan-Bildungsrate im Vergleich zu unstimulierter Mikroglia. PYC hat in einer Konzentration von 10, 25, 50 und 100µg/ml bei einer Stimulationszeit von 24 Stunden keinen zytotoxischen Effekt auf die Mikroglia, vielmehr kommt es durch PYC ab einer Konzentration von 25µg/ml zu einer Steigerung der Formazan-Bildungsrate, die bei simultaner Stimulation mit PYC und LPS in zunehmender Konzentration vermehrt abgeschwächt wird (Abbildung 2a). In allen folgenden Versuchen wird die PYC-Konzentration von 25µg/ml verwendet, da die Zellviabilität bei simultaner Stimulation mit PYC und LPS für diese Konzentration am höchsten ist. Durch Stimulation mit PYC [25µg/ml] kommt es zu einer signifikanten Steigerung der Formazan-Bildungsrate um 59,6% im Vergleich zur Kontroll- und LPS-stimulierten Mikroglia, was für eine gesteigerte Viabilität und demgemäß für eine Zellproliferation spricht. Durch simultane Stimulation mit PYC und LPS wird die Formazanbildungsrate um 20,3% reduziert, ist aber deutlich erhöht im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 2b).

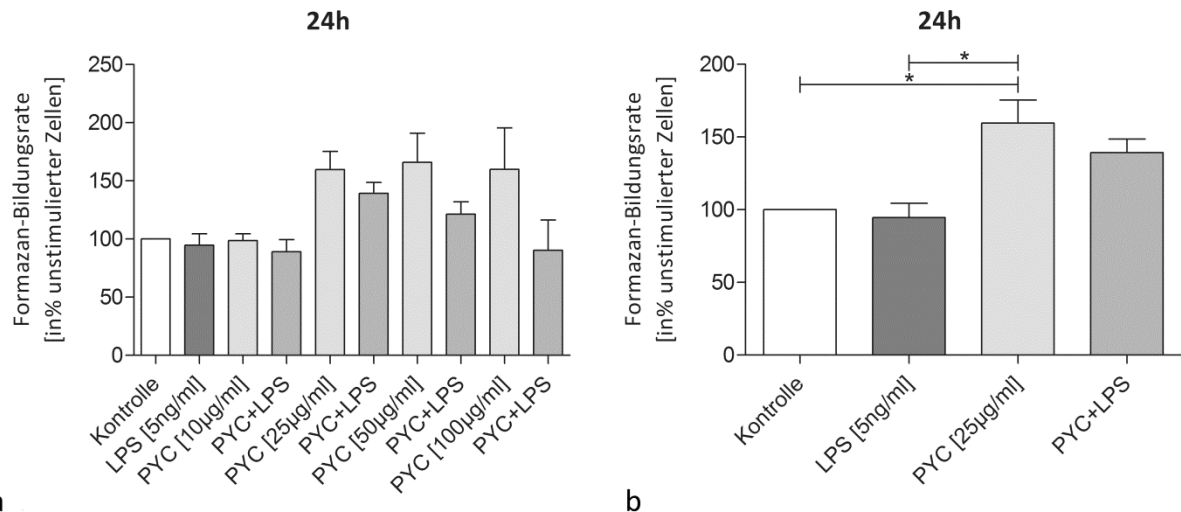


Abb. 2 Einfluss von PYC auf die Formazan-Bildungsrate in primärer Mikroglia. **a** Nach Zugabe von MTT erfolgte zunächst eine Solubilisierung und Lyse der Mikroglia. Anschließend wurde die Formazan-Bildungsrate in den Stimulationsansätzen (Kontrolle; LPS[5ng/ml]; PYC[10; 25; 50; 100µg/ml]; PYC+LPS) nach einer Stimulationszeit von 24h photometrisch bestimmt. Die Messwertangaben erfolgen in % unstimulierter Mikroglia. **b** Alle weiteren Versuche erfolgten mit PYC in einer Konzentration von 25µg/ml. (Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$)

4.2 PYC beeinflusst die Morphologie primärer Mikroglia

Aus dem veränderten Funktionszustand der primären Rattenmikroglia aus den Stimulationsansätzen (Kontrolle, LPS [5ng/ml], PYC + LPS, PYC [25µg/ml]) ergeben sich morphologische Veränderungen. Die lichtmikroskopische Untersuchung der mittels Coomassie-Blau gefärbten Zellen erfolgte nach einer Stimulationszeit von 48 Stunden. Unstimulierte Mikroglia (Kontrolle) befindet sich in einem scheinbar ruhenden Zustand mit kleinen Zellsomata sowie geringem Zytoplasmaanteil und vernetzten, zarten Ausläufern, sogenannten Ramifikationen (Abbildung 3a). Die Stimulation mit LPS führt zu einer charakteristischen Transformation der Mikroglia mit deutlich vergrößerten Zellsomata, einer amöboiden Form sowie weitestgehend retrahierten Zellausläufern (Abbildung 3b). Die mit PYC allein stimulierten Mikrogliazellen weisen zwar vergrößerte Zellsomata auf, sind aber im Gegensatz zu den LPS-stimulierten Zellen eher länglich und entwickeln deutlich verdickte Zellausläufer (Abbildung 3c). Bei simultaner Stimulation der Mikroglia mit PYC und LPS zeigen sich die Zellen eher amöboid mit vergrößerten Zellsomata und gleichen somit der LPS-aktivierten Zustandsform (Abbildung 3d). Sowohl bei alleiniger Stimulation mit PYC als auch in Kombination mit LPS zeigen sich die Zellen vital und die Zelldichte scheint zuzunehmen.

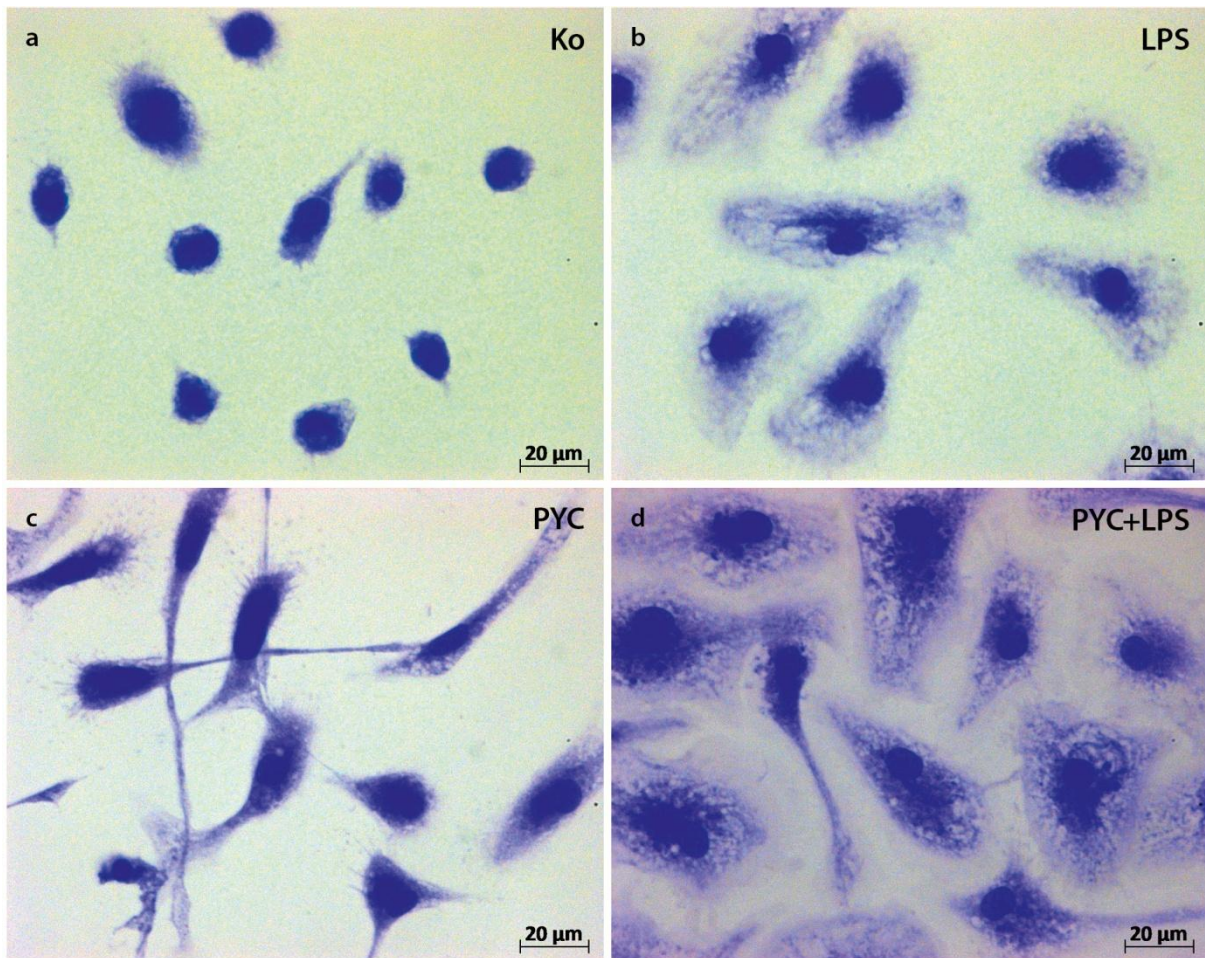


Abb. 3 Einfluss von PYC auf die Morphologie primärer Mikroglia. Die Stimulationszeit betrug 48 Stunden. Die Färbung erfolgte mittels Coomassie-Blau. **a** Unstimulierte Mikroglia zeigen kleine Zellsomata und Ramifikationen. **b** Nach Stimulation mit LPS weisen die Mikroglia vergrößerte Zellsomata und eine amöboide Form auf. **c** PYC induziert eine Mikrogliastransformation mit vergrößerten Zellsomata sowie einer länglichen Zellform. Einige Zellen entwickeln deutliche Ramifikationen. **d** Mit PYC und LPS stimulierte Mikrogliazellen zeigen eine ausgeprägte Größenzunahme sowie weniger Ramifikationen als die mit PYC stimulierten Zellen. **c, d** Sowohl bei alleiniger Stimulation mit PYC als auch in Kombination mit LPS zeigen sich die Zellen vital und es kommt zu einer scheinbaren Verdichtung der Zellen.

4.3 PYC beeinflusst die mRNA-Menge und die Proteinfreisetzung von Entzündungsmediatoren in primärer Mikroglia

4.3.1 PYC senkt die mRNA-Menge von Entzündungsmediatoren nach LPS-Stimulation

Im Zuge der klassischen Mikroglia-Aktivierung kommt es zur Induktion proinflammatorischer Zytokine und Enzyme. Bei lang anhaltender und überschießender Aktivierung kann es durch diese Entzündungsmediatoren zur Schädigung oder zum Untergang von Neuronen im Rahmen des IPS kommen (Cherry et al. 2014, Pessoa Rocha et al. 2015). Nachdem die mRNA aus den Stimulationsansätzen LPS [5ng/ml], PYC + LPS, PYC [25µg/ml] sowie den Kontrollansätzen zunächst isoliert und in cDNA umgeschrieben worden war, erfolgte die relative Quantifizierung der Genexpression der Entzündungsmediatoren TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2 und MMP-9 mittels qPCR unter Verwendung des TaqMan®-Systems. Die Stimulationszeiten betrugen jeweils 3, 6 und 24 Stunden. Da LPS als Oberflächenbestandteil gramnegativer Bakterien einen klassischen Induktor proinflammatorischer Mikrogliareaktionen darstellt, dienen die LPS- stimulierten Zellen als Vergleichskontrollen, um auf den Aktivierungszustand schließen zu können. Dementsprechend sind die Messwerte als Relativwert (in %) LPS-stimulierter Mikroglia dargestellt und die Signifikanzangaben für die Änderungen der mRNA-Menge stehen ebenfalls in Relation zu den LPS-stimulierten Ansätzen.

4.3.1.1 PYC senkt die mRNA-Menge von TNF- α nach LPS-Stimulation

Die mRNA-Menge von TNF- α in LPS-stimulierter Mikroglia ist für alle Stimulationszeiten signifikant erhöht im Vergleich zur unstimulierten (Kontrolle) und PYC-stimulierten Mikroglia. Bei simultaner Stimulation mit PYC und LPS ergibt sich nach allen Stimulationszeiten eine zunehmend signifikante Reduktion der LPS-induzierten mRNA-Menge TNF- α um 19,1% nach 3 Stunden, um 30,1% nach 6 Stunden und um 70,3% nach 24 Stunden.

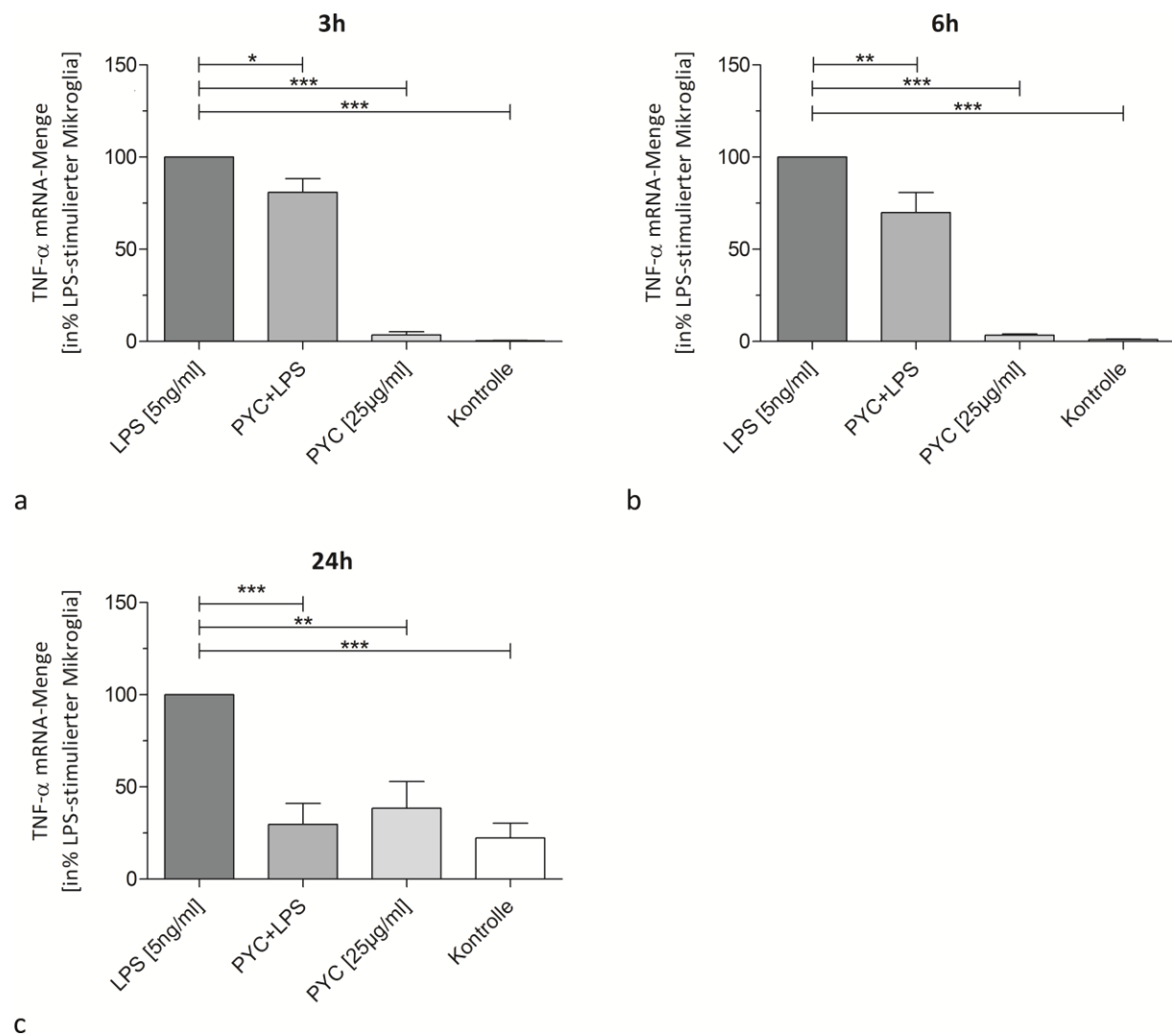


Abb. 4 Einfluss von PYC auf die mRNA-Menge von TNF- α in primärer Mikroglia. Nachdem die mRNA aus den Stimulationsansätzen (LPS[5ng/ml]; PYC+LPS; PYC[25 μ g/ml]; Kontrolle) nach 3, 6 und 24h (a-c) zunächst isoliert und in cDNA umgeschrieben wurde, erfolgte die qPCR mittels TaqMan®-Technologie. Die Messwertangaben erfolgen in % LPS-stimulierter Mikroglia. (Mittelwert \pm SEM, n \geq 3; ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05)

4.3.1.2 PYC senkt die mRNA-Menge von IL-1 β nach LPS-Stimulation

Wie bei TNF- α ist auch die mRNA-Menge von IL-1 β in den LPS-aktivierten Zellen für alle Stimulationszeiten signifikant höher als in den in den Kontroll- und PYC-stimulierten Mikrogliazellen. Durch simultane Stimulation der Mikroglia mit PYC und LPS wird die mRNA-Menge von IL-1 β signifikant um 54,5% nach 3 Stunden, um 48,4% nach 6 Stunden und um 82,0% nach 24 Stunden reduziert.

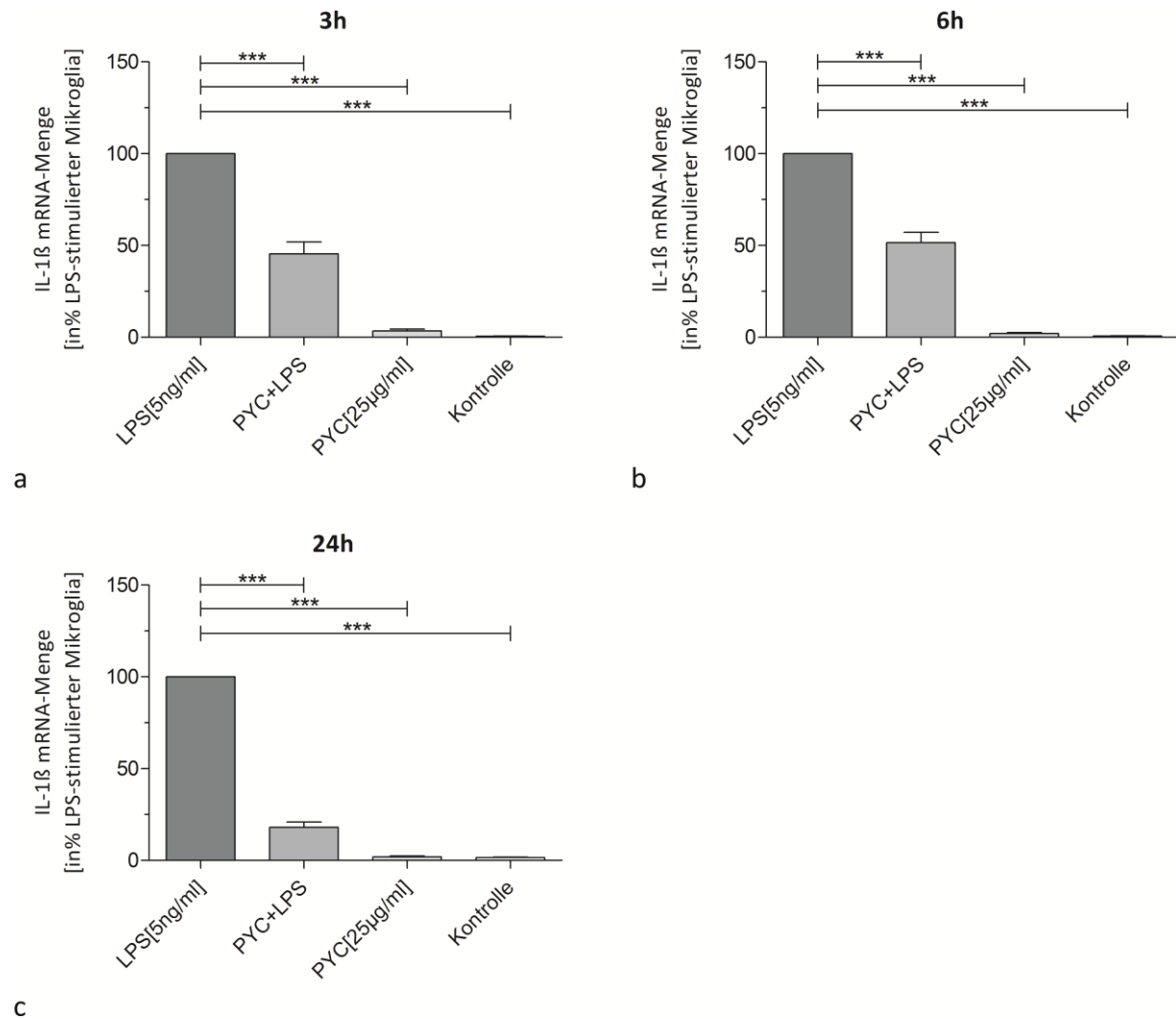


Abb. 5 Einfluss von PYC auf die mRNA-Menge von IL-1 β in primärer Mikroglia. Zunächst wurde die mRNA aus den Stimulationsansätzen (LPS[5ng/ml]; PYC+LPS; PYC[25 μ g/ml]; Kontrolle) isoliert und in cDNA umgeschrieben, dann erfolgte die qPCR mittels TaqMan®-Technologie. Die Stimulationszeiten betrugen 3, 6 und 24h (a-c). Die Messwertangaben erfolgen in % LPS-stimulierter Mikroglia. (Mittelwert \pm SEM, $n \geq 3$; *** $p < 0,001$)

4.3.1.3 PYC senkt die mRNA-Menge von IL-6 nach LPS-Stimulation

Auch für IL-6 ist die mRNA-Menge im Vergleich zur Kontroll- und PYC-stimulierten Mikroglia in den LPS-stimulierten Zellen für alle Stimulationszeiten signifikant erhöht. Bei gleichzeitiger Stimulation der Zellen mit PYC und LPS sinkt die LPS-induzierte mRNA-Menge von IL-6 signifikant um 32,7% nach 3 Stunden, um 32,9% nach 6 Stunden und um 71,7% nach 24 Stunden.

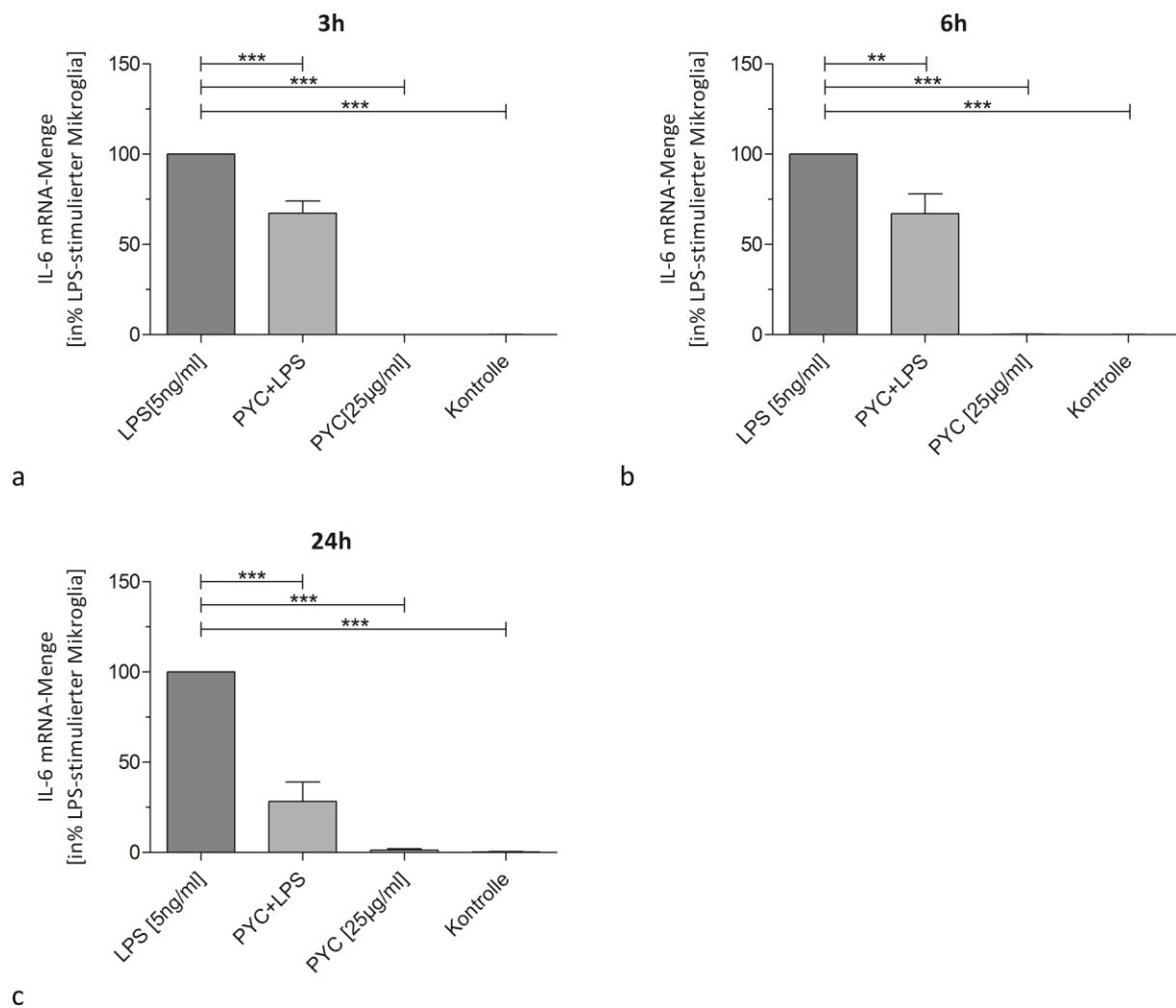


Abb. 6 Einfluss von PYC auf die mRNA-Menge von IL-6 in primärer Mikroglia. Nach Isolierung der für 3, 6, und 24h (a-c) stimulierten mRNA aus den Versuchsansätzen (LPS [5ng/ml]; PYC+LPS; PYC [25µg/ml]; Kontrolle), wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben und mittels TaqMan®-qPCR quantifiziert. Die Messwertangaben erfolgen in % LPS-stimulierter Mikroglia. (Mittelwert \pm SEM, $n \geq 3$; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

4.3.1.4 PYC senkt die mRNA-Menge von COX-2 nach LPS-Stimulation

Für COX-2 ergibt sich wie für die untersuchten proinflammatorischen Zytokine für alle Stimulationszeiten eine signifikant erhöhte mRNA-Menge in den LPS-stimulierten Zellen im Vergleich zur unstimulierten (Kontrolle) und PYC-stimulierten Mikroglia. Bei simultaner Stimulation der Zellen mit PYC und LPS ist die mRNA-Menge von COX-2 signifikant geringer als bei LPS-aktivierten Zellen. Nach 3 Stunden sinkt die mRNA-Menge auf 35,7%, nach 6 Stunden um 28,7% und nach 24 Stunden um 44,1%.

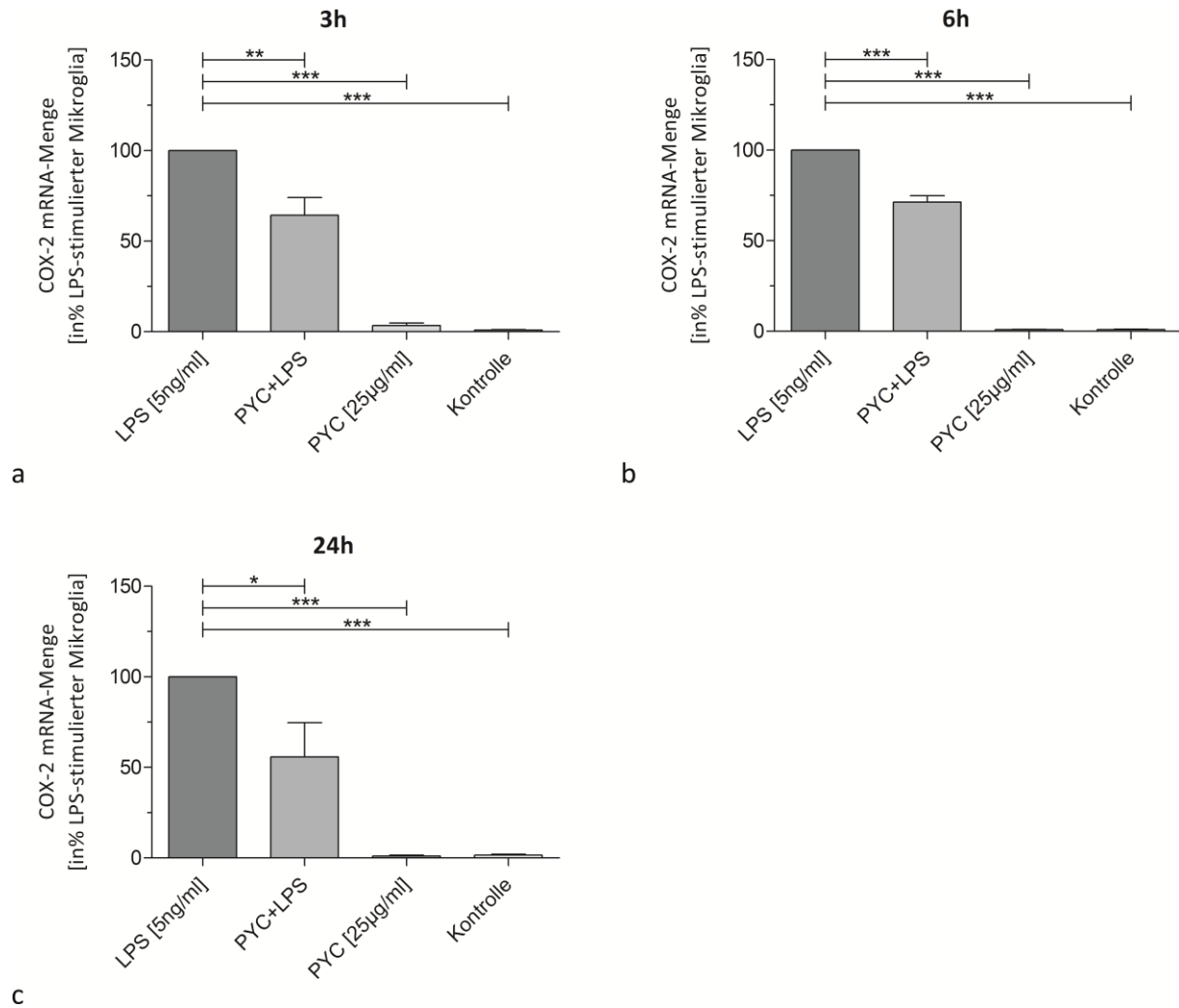


Abb. 7 Einfluss von PYC auf die mRNA-Menge von COX-2 in primärer Mikroglia. Die mRNA aus den entsprechenden Stimulationsansätzen (LPS[5ng/ml]; PYC+LPS; PYC[25µg/ml]; Kontrolle) wurde nach einer Stimulationszeit von 3, 6, und 24h (a-c) zunächst isoliert und in cDNA umgeschrieben, dann erfolgte die qPCR mittels TaqMan®-Technologie. Die Messwertangaben erfolgen in % LPS-stimulierter Mikroglia. (Mittelwert \pm SEM, $n \geq 3$; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

4.3.1.5 PYC senkt die mRNA-Menge von MMP-9 nach LPS-Stimulation

Auch die mRNA-Menge von MMP-9 in LPS-aktivierter Mikroglia ist für alle Stimulationszeiten signifikant größer als in der Kontroll- und PYC-stimulierten Mikroglia. Bei simultaner Stimulation der Zellen mit PYC und LPS sinkt die LPS-induzierte mRNA-Menge von COX-2 für alle Stimulationszeiten signifikant um 39,3% nach 3 Stunden, um 39,5% nach 6 Stunden und um 58,4% nach 24 Stunden.

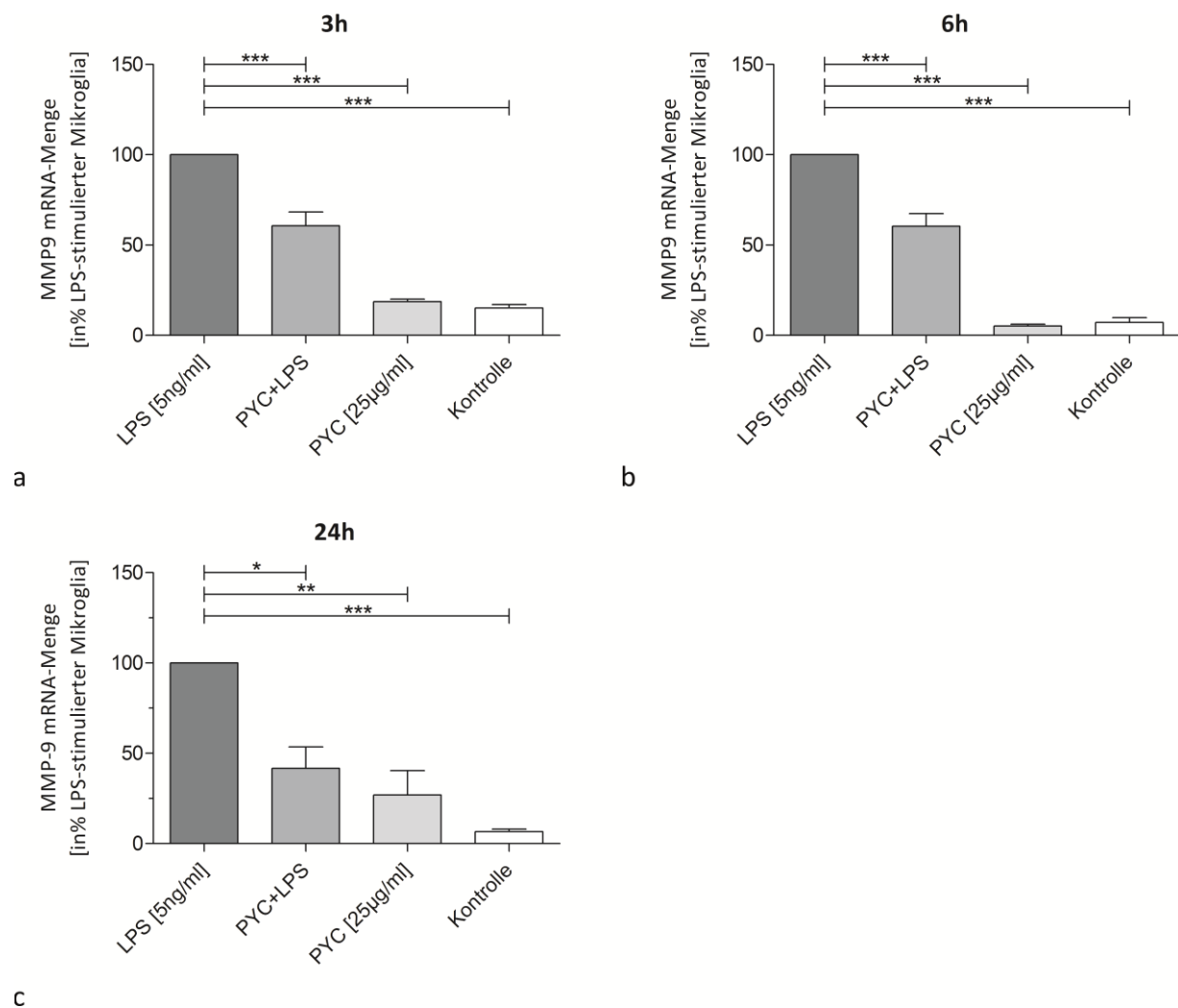


Abb. 8 Einfluss von PYC auf die mRNA-Menge von MMP-9 in primärer Mikroglia. Nach den Stimulationszeiten von 3, 6, und 24h (a-c) wurde die mRNA aus den entsprechenden Stimulationsansätzen (LPS[5ng/ml]; PYC+LPS; PYC[25µg/ml]; Kontrolle) zunächst isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die qPCR erfolgte dann mittels TaqMan®-Technologie. Die Messwertangaben erfolgen in % LPS-stimulierter Mikroglia (Mittelwert ± SEM, n≥3; ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05).

4.3.2 PYC beeinflusst die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine

Nachdem der Einfluss von PYC auf die mRNA-Menge proinflammatorischer Zytokine und Enzyme mittels qPCR analysiert worden war, erfolgte der Nachweis von IL-6 und TNF- α auf Proteinebene. Mittels eines enzymgekoppelten Adsorptionstests (*enzyme-linked-immunosorbent-assay*, ELISA), wurde die Protein-Menge von TNF- α und IL-6 im Zellkulturüberstand der Stimulationsansätze LPS [5ng/ml], PYC + LPS, PYC [25 μ g/ml] sowie der Kontrollansätze bestimmt, um Rückschlüsse auf die Freisetzung dieser Zytokine durch Mikroglia ziehen zu können. Da LPS klassischerweise die Produktion von Entzündungsmediatoren in Mikroglia induziert, sind die Messwerte als Relativwert (in %) der Protein-Freisetzung in den Zellkulturüberstand LPS-stimulierter Mikroglia dargestellt. Die Signifikanzangaben für die Änderungen der Messwerte stehen ebenfalls in Relation zu den LPS-stimulierten Ansätzen.

4.3.2.1 PYC beeinflusst die TNF- α -Freisetzung in den Zellkulturüberstand nach LPS-Stimulation

Die TNF- α -Menge im Zellkulturüberstand LPS-stimulierter Mikroglia ist für alle Stimulationszeiten signifikant erhöht im Vergleich zur Kontroll- und PYC-stimulierten Mikroglia. PYC allein zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die Freisetzung von TNF- α . Bei simultaner Stimulation der Mikroglia mit PYC und LPS steigt die LPS induzierte TNF- α -Freisetzungsrates nach 3 Stunden tendenziell um 29,2 %. Nach 6 Stunden ergibt sich ein signifikanter Anstieg um 22,5% und nach 24 Stunden um 50,2%.

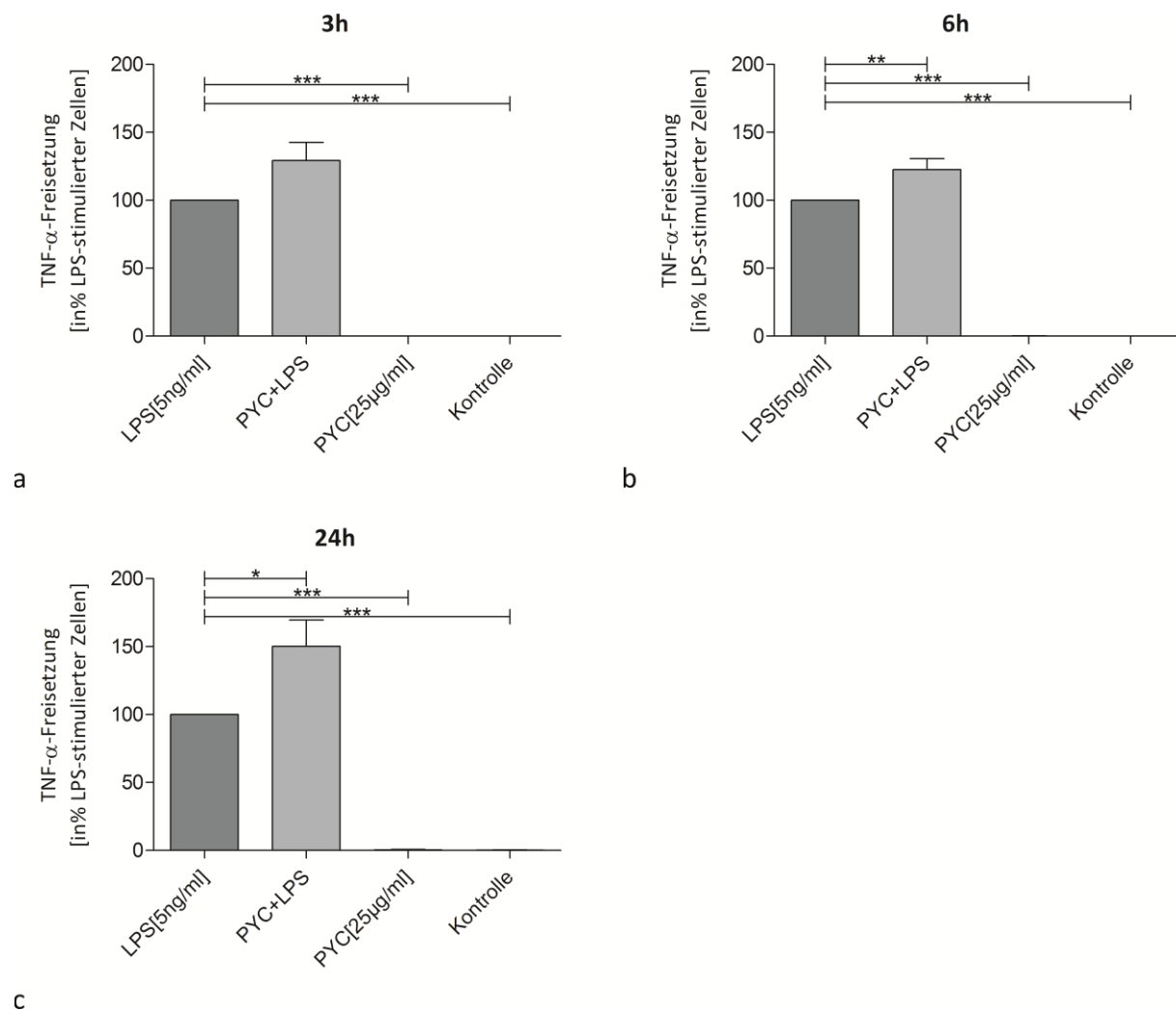


Abb. 9 Einfluss von PYC auf die Freisetzung von TNF- α in den Zellkulturüberstand primärer Mikroglia. Der Proteinnachweis von TNF- α erfolgte mittels ELISA im Zellkulturüberstand der entsprechenden Stimulationsansätzen (LPS[5ng/ml]; PYC+LPS; PYC[25 μ g/ml]; Kontrolle) nach einer Stimulationszeit von 3, 6, und 24h (a-c). Die Messwertangaben erfolgen in % LPS-stimulierter Mikroglia. (Mittelwert \pm SEM, $n \geq 3$; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

4.3.2.2 PYC beeinflusst die IL-6-Freisetzung in den Zellkulturüberstand nach LPS-Stimulation

Für IL-6 ergibt sich für alle Stimulationszeiten eine signifikant erhöhte Freisetzung in den Zellkulturüberstand LPS-stimulierter Mikroglia im Vergleich zu Kontrolle und PYC-stimulierten Zellen. PYC allein zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die TNF- α -Protein-Menge. Bei simultaner Stimulation der Mikroglia mit PYC und LPS sinkt die LPS-induzierte IL-6-Protein-Menge nach 3 Stunden um 48,5 %. Nach 6 Stunden zeigt sich kein Einfluss von PYC auf die LPS-stimulierten Zellen. Nach 24 Stunden kommt es zu einem signifikanten Anstieg der IL-6-Freisetzung um 45 % im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit LPS.

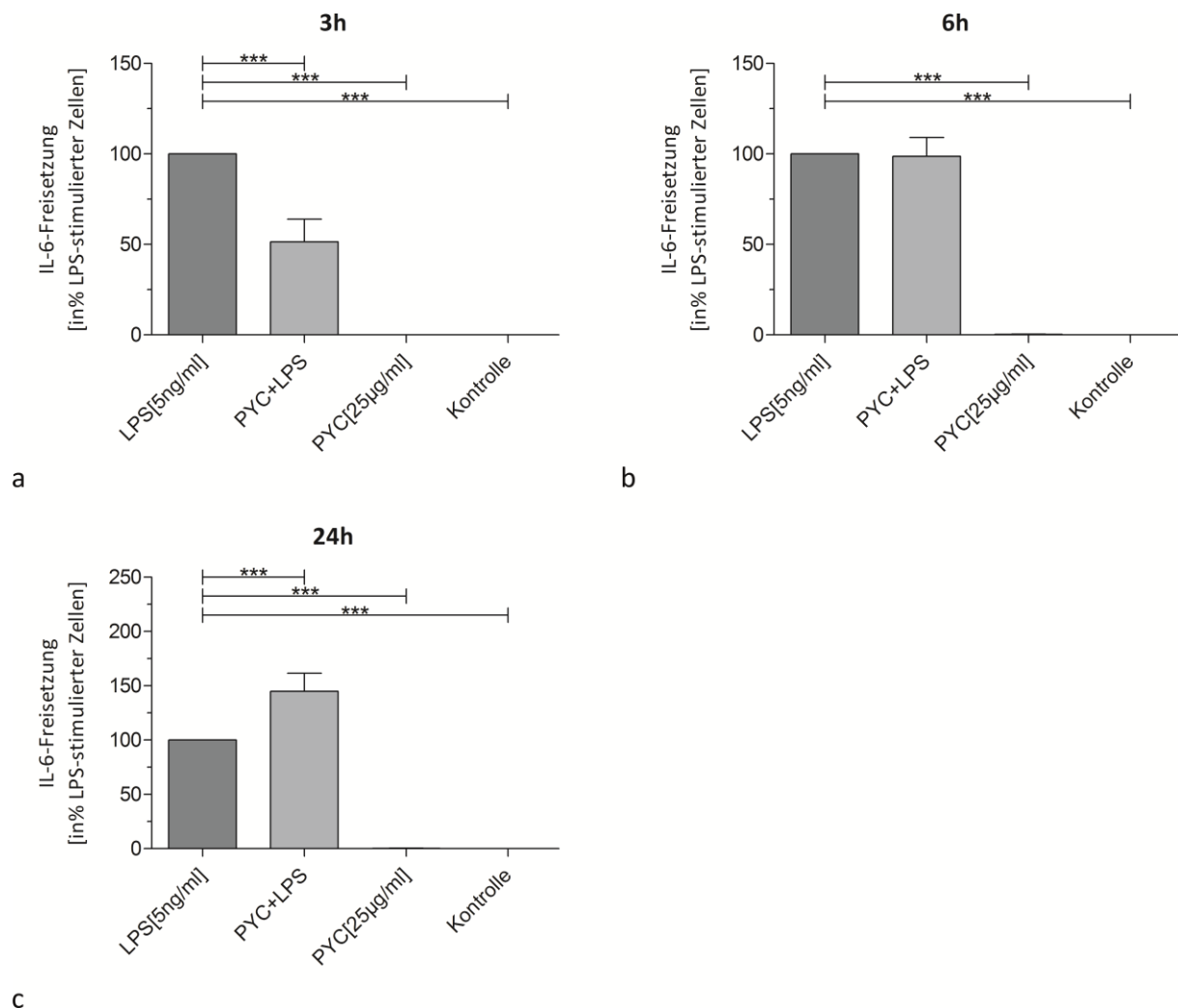


Abb. 10 Einfluss von PYC auf die IL-6-Freisetzung in den Zellkulturüberstand primärer Mikroglia. Der Proteinnachweis von IL-6 erfolgte nach einer Stimulationszeit von 3, 6, und 24h (a-c) mittels ELISA im Zellkulturüberstand der entsprechenden Stimulationsansätze (LPS[5ng/ml]; PYC+LPS; PYC[25µg/ml]; Kontrolle). Die Messwertangaben erfolgen in % LPS-stimulierter Mikroglia. (Mittelwert \pm SEM, $n \geq 3$; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$)

4.4 PYC steigert die Freisetzung von NO unabhängig von der induzierbaren NO-Synthase (iNOS)

Eine massive Freisetzung von NO dient als Indikator für eine Mikroglia-Aktivierung. Im Rahmen von Immun- und Entzündungsreaktionen kommt es zur vermehrten Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und zur Synthese großer NO-Mengen (Steinert et al. 2010). Da LPS, als Oberflächenbestandteil gramnegativer Bakterien, eine Immunantwort durch Mikroglia induziert, dienen die LPS-stimulierten Zellen als Vergleichsgrößen, um Rückschlüsse auf den Aktivierungszustand zu ziehen. Die NO-Freisetzungsrate sowie die mRNA-Menge von iNOS sind daher als Relativwert (in % LPS-stimulierter Mikroglia) dargestellt. Die Signifikanzangaben für die Änderung der Messwerte stehen ebenfalls in Relation zu den LPS-stimulierten Ansätzen.

4.4.1 PYC steigert die NO-Freisetzung durch primäre Mikroglia

Die Messung des flüchtigen Gases NO erfolgte indirekt mittels Griess-Reagenz in den Zellkulturüberständen der Stimulationsansätze LPS [5ng/ml], PYC + LPS, PYC [25µg/ml] sowie den Kontrollansätzen. Nach 6 und 24 Stunden setzen die unstimulierten Mikrogliazellen (Kontrolle) NO in geringem Maße frei. PYC führt jeweils zu einer leichten Steigerung der NO-Freisetzungsrate im Vergleich zur unstimulierten Mikroglia. Die Grundraten der Kontroll- und PYC-stimulierten Mikroglia lassen sich durch die LPS-Stimulation für beide Stimulationszeiten signifikant steigern. Bei simultaner Stimulation mit PYC und LPS steigt die NO-Freisetzungsrate nach 6 Stunden um 11,7 % im Vergleich zu den LPS-stimulierten Ansätzen. Nach 24 Stunden ergibt sich ein signifikanter Anstieg um 26 %.

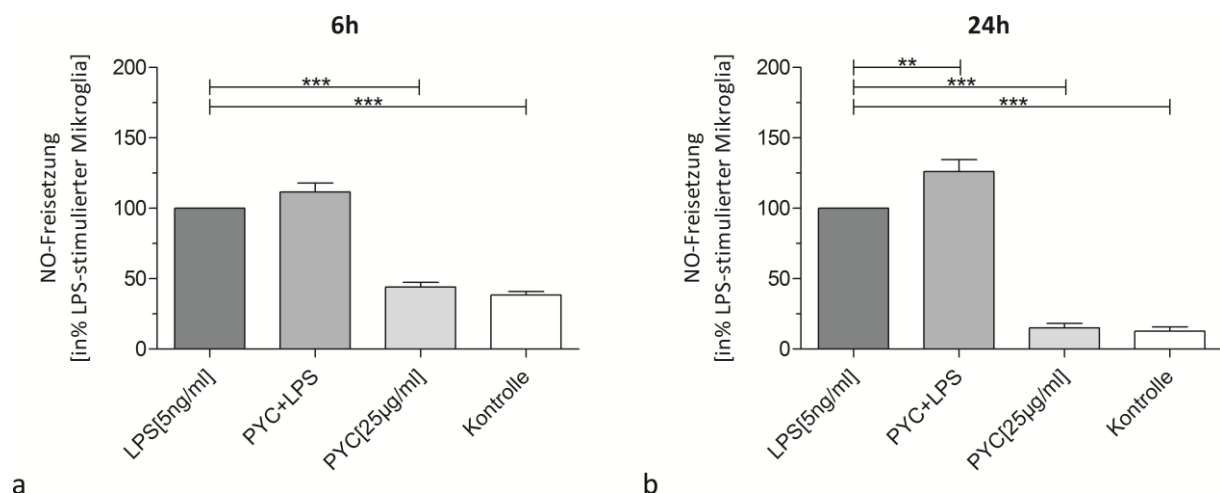


Abb. 11 Einfluss von PYC auf die LPS-induzierte NO-Freisetzungsrate in primärer Mikroglia. Die NO-Messung erfolgte mittels Griess-Reagenz im Zellkulturüberstand der Stimulationsansätze (LPS[5ng/ml]; PYC+LPS; PYC[25µg/ml]; Kontrolle) nach einer Stimulationszeit von 6 und 24h (a, b). Die Messwertangaben erfolgen in % LPS-stimulierter Mikroglia. (Mittelwert \pm SEM, $n \geq 3$; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$)

4.4.2 PYC senkt die mRNA-Menge der induzierbaren NO-Synthase nach LPS-Stimulation

Nachdem die mRNA aus den Stimulationsansätzen LPS [5ng/ml], PYC + LPS, PYC [25µg/ml] sowie den Kontrollansätzen zunächst isoliert und in cDNA umgeschrieben worden war, erfolgte die relative Quantifizierung der iNOS-Genexpression mittels qPCR unter Verwendung des TaqMan®-Systems. Die mRNA-Menge von iNOS in LPS-aktivierter Mikroglia ist im Vergleich zur unstimulierten (Kontrolle) und PYC-stimulierten Mikroglia für alle Stimulationszeiten signifikant erhöht. Bei simultaner Stimulation der Mikroglia mit PYC und LPS ergibt sich nach 3 Stunden keine signifikante Veränderung der LPS-induzierten iNOS-mRNA-Menge. Nach 6 Stunden sinkt die iNOS-mRNA-Menge um 10,3%. Nach 24 Stunden ergibt sich eine Reduktion um 6,5%.

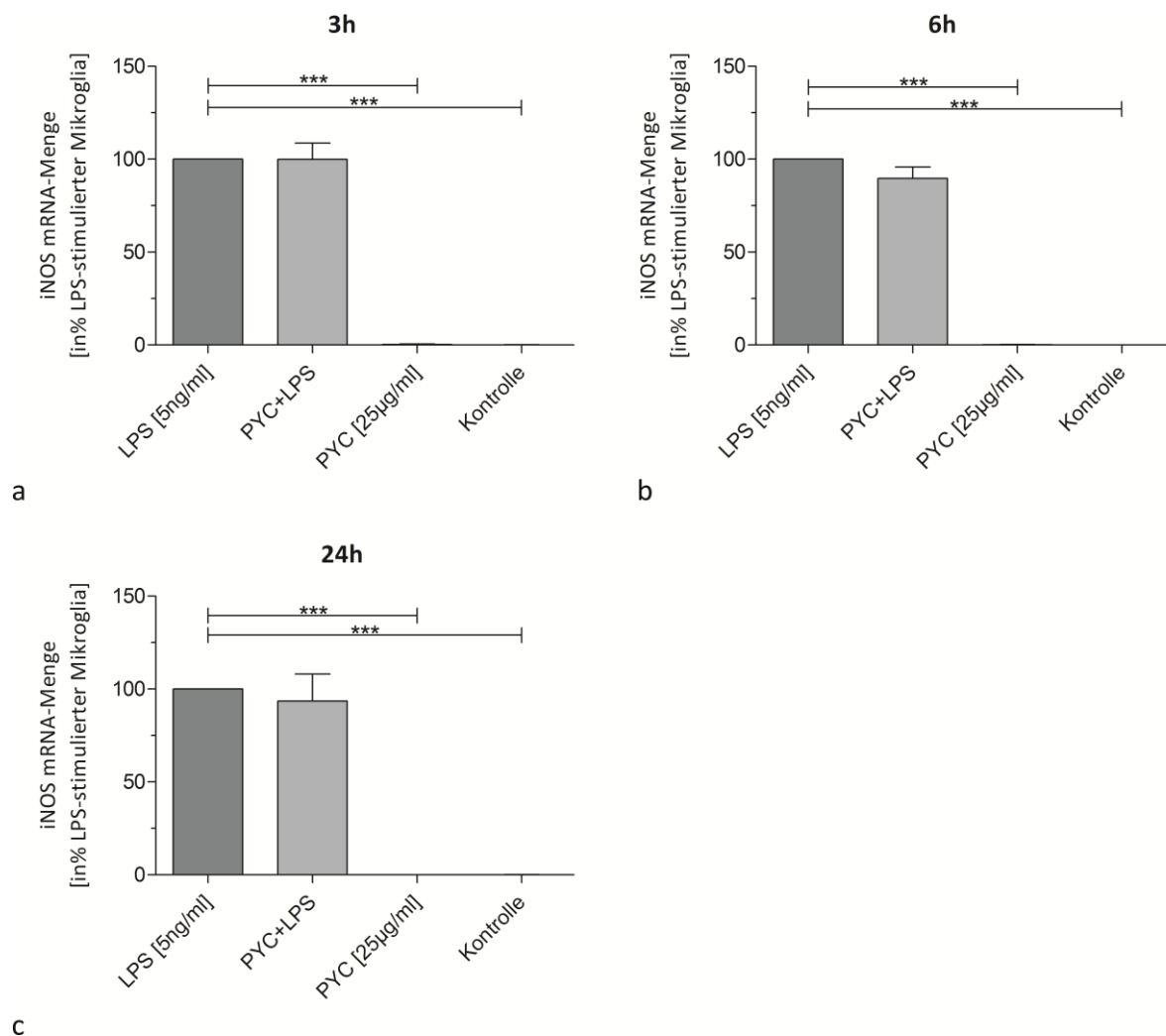


Abb. 12 Einfluss von PYC auf die mRNA-Menge von iNOS in primärer Mikroglia. Nachdem die mRNA aus den Stimulationsansätzen (LPS[5ng/ml]; PYC+LPS; PYC[25µg/ml]; Kontrolle) nach einer Stimulationszeit von 3, 6, 24 und 30h (a-c) zunächst isoliert und in cDNA umgeschrieben wurde, erfolgte die qPCR mittels TaqMan®-Technologie. Die Messwertangaben erfolgen in % LPS-stimulierter Mikroglia. (Mittelwert ± SEM, n≥3; ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05)

4.5 PYC reduziert die Aktivierung von MAPK-Signalwegen in primärer Mikroglia nach LPS-Stimulation

Die MAPK spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion im Rahmen von entzündlichen Prozessen. Ein erhöhter Anteil phosphorylierter MAPK spricht für eine Aktivierung des entsprechenden Signalwegs. Um den Einfluss von PYC auf die Induktion MAPK-Signalwege zu untersuchen, erfolgte der spezifische Nachweis der phosphorylierten ERK1/2 und p38-Kinasen im Verhältnis zu unphosphorylierten p38 und ERK2 in den Simulationsansätzen (Kontrolle, LPS [5ng/ml], PYC + LPS, PYC [25µg/ml]) mittels Western-Blot-Analyse. Da LPS eine Phosphorylierung von ERK und p38-Kinasen induziert, dienen die LPS-stimulierten Zellen als Positivkontrollen. In Abbildung 13 sind jeweils repräsentative Western-Blots für p38 und pp38 beziehungsweise ERK2 und pERK1/2 nach 10-minütiger Stimulationszeit dargestellt. Bei simultaner Stimulation mit PYC und LPS scheint die LPS-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 und p38 tendenziell reduziert zu werden.

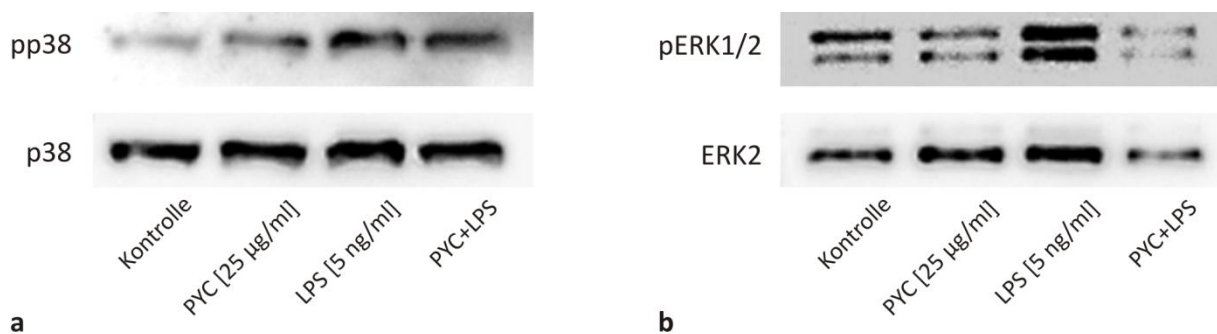


Abb. 13 Einfluss von PYC a auf die Phosphorylierung von p38 und b ERK1/2 in primärer Mikroglia. Die Western-Blot-Analyse erfolgte nach einer Stimulationszeit von 10min. Nach Auftrennung des Proteingemisches mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese erfolgte die Übertragung (Blotting) auf eine Trägermembran. Dargestellt sind die Proteinbanden von pp38 und pERK1/2 und den jeweiligen Protein-Markern p38 und ERK2.

Die Intensitätsunterschiede der Proteinbanden wurden mittels Chemilumineszenz detektiert und quantifiziert. Die Ergebnisse für die Proteine Menge von pp38 und pERK1/2 stehen in Relation zu den Protein-Markern p38 und ERK2 und sind als Relativwert (in %) LPS-stimulierter Mikroglia angegeben. Abbildung 14 zeigt den relativen Anteil an pp38 sowie pERK1/2 der LPS-aktivierten Zellen im Vergleich zu den mit PYC und LPS simultan stimulierten Ansätzen. PYC reduziert die LPS-induzierte Phosphorylierung und somit die Aktivierung von p38 um 14,8 % und von ERK1/2 um 14,4%.

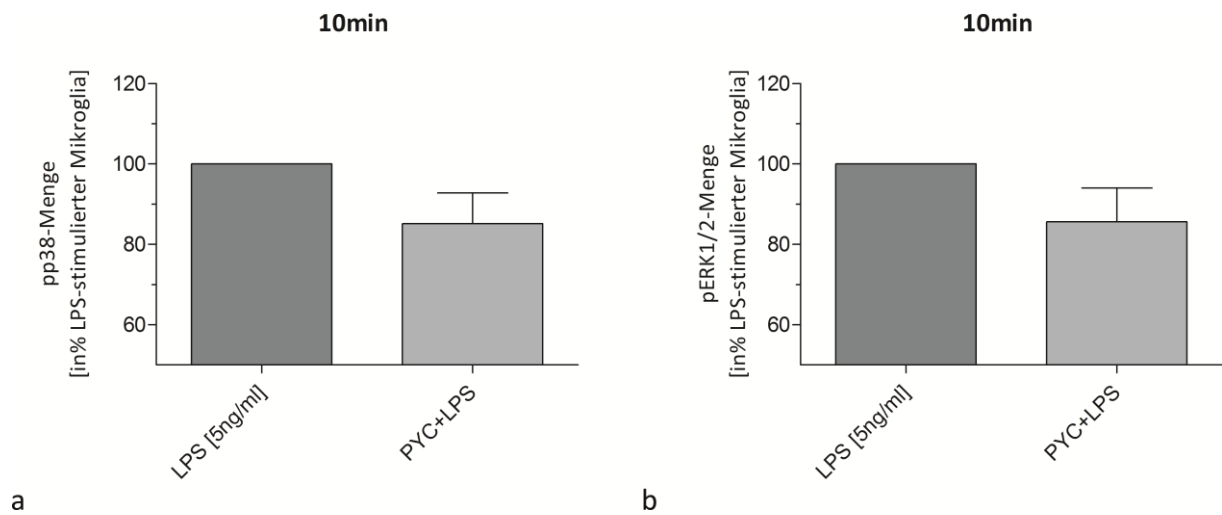


Abb. 14 Prozentualer Anteil an pp38 und pERK1/2 Nach Übertragung (Blotting) auf eine Membran, wurden die Proteine mittels Chemilumineszenz detektiert und quantifiziert. Dargestellt sind die Ergebnisse für die simultan mit LPS und PYC stimulierten Ansätze im Vergleich zur LPS-Gruppe. Die Messwertangaben erfolgen in % LPS-stimulierter Mikroglia. PYC reduziert die LPS-induzierte Phosphorylierung von **a** p-38-MAPK und **b** ERK1/2.

5. Diskussion

Zahlreiche Studien belegen eine neuroinflammatorische Komponente bei der Pathogenese des IPS (Hirsch et al. 2012, Mogi et al. 1996). Mikrogliazellen sind die Makrophagen des ZNS und nehmen sowohl im scheinbar ruhenden als auch im aktivierten Zustand eine Schlüsselrolle bei der Homöostase und bei der Vermittlung von Immun- und Entzündungsreaktionen ein. Neben ihren zahlreichen physiologischen Funktionen sind Mikrogliazellen in nahezu alle Neuropathologien wie zum Beispiel auch das IPS involviert. Die Anwesenheit von aktivierter MHC-II-positiver Mikroglia mit vermehrter Expression von potentiell neurotoxischen Mediatoren wie $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-6 sowie den entzündungsassoziierten Enzymen COX-1 und COX-2 oder iNOS konnten *post mortem* im Hirnparenchym von Parkinson-Patienten immunhistochemisch nachgewiesen werden (Hirsch & Hunot 2009, Imamura et al. 2003, Knott et al. 2000). Durch die absterbenden Neurone kommt es wiederum zu einer vermehrten Aktivierung der für die Phagozytose von Zelldebris verantwortlichen Mikroglia und somit zu einer Art „degenerativem Teufelskreis“ (Hirsch & Hunot 2009, Pessoa Rocha et al. 2015). Bis heute sind die molekularen Mechanismen und die Kommunikation der Mikroglia sowie ihre physiologischen und pathologischen Funktionen nicht abschließend geklärt. Weitere Untersuchungen zur Identifikation möglicher Modulatoren der Mikroglia-Aktivität sind dringend erforderlich. Basierend auf der Neuroinflammations-Hypothese kann eine pharmakologische Hemmung proinflammatorischer Mikrogliaereaktionen eine vielversprechende Möglichkeit zur kausalen Prävention und Therapie des IPS darstellen. In verschiedenen experimentellen Parkinsonmodellen konnten Nichtsteroideale Entzündungshemmer (engl. *non-steroidal anti-inflammatory drug*; NSAID) den Verlust dopaminergener Neurone eindämmen, dennoch waren die Effekte verschiedener antiinflammatorischer Medikamente uneinheitlich. Die hierfür zu Grunde liegenden Mechanismen bleiben unklar (Esposito et al. 2007). In einer prospektiven Studie der *Harvard School of Public Health* in Boston mit 136.197 Teilnehmern reduzierte Ibuprofen das Parkinson-Risiko signifikant. Interessanterweise konnte dieser Effekt nicht für andere anti-inflammatorische Medikamente wie Aspirin oder Paracetamol festgestellt werden (Gao et al. 2011). Weitere Studien der Arbeitsgruppe um Gao zeigten einen positiven Einfluss von Flavenoiden auf das Parkinson-Risiko (Gao et al. 2012). Aufgrund seiner anti-oxidativen und anti-inflammatorischen Kapazität und der Fähigkeit in enzymatische Regulationsmechanismen einzugreifen, kann der flavenoidreiche

Pflanzenextrakt PYC einen therapeutischen Ansatzpunkt für das IPS darstellen. Die im Folgenden diskutierten *in-vitro*-Untersuchungen sollen Informationen über ein mögliches neuroprotektives Potential von PYC erbringen und eine mögliche Option zur Prävention des IPS aufzeigen.

5.1 *In-vitro*-Kultivierung der Mikroglia

Die Untersuchungen des Einflusses von PYC auf Mikroglia erfolgten anhand eines *in-vitro*-Modells mit etablierten primären Rattenmikroglia-Zellkulturen des Stammes *Sprague Dawley*. LPS ist ein bakterielles Endotoxin und gilt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als anerkannter Induktor proinflammatorischer Mikrogliareaktionen, die mit der Degeneration dopaminerger Neurone beim IPS assoziiert sind (Dutta et al. 2008, Gayle et al. 2002). Die LPS-stimulierten Zellen dienten daher als Positivkontrollen für die Mikroglia-Aktivierung. Auf diese Weise ließ sich die neuro-inflammatorische Komponente bei der Pathogenese des IPS experimentell rekonstruieren. In Untersuchungen unserer und anderer Arbeitsgruppen kam es in Folge der LPS-Stimulation *in vitro* und *in vivo* zur vermehrten Freisetzung der Entzündungsmediatoren NO, TNF- α , IL-1 α/β , IL-6, PG-E₂ sowie Superoxid (O₂⁻) durch Mikroglia (Dutta et al. 2008, Liu & Bing 2011, Wilms et al. 2010, Wilms et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression und die Freisetzung der untersuchten proinflammatorischen Zytokine und entzündungsassoziierten Enzyme mit LPS deutlich erhöht. Zudem zeigten die hier untersuchten LPS-aktivierten Zellen übereinstimmend mit anderen Arbeitsgruppen eine eher amöboide phänotypische Differenzierung (Hines et al. 2013, Stence et al. 2001, Wilms et al. 2003). Diese Befunde und die konstante Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sprechen für ein verlässliches Versuchsmodell. PYC zeigte in der vorliegenden Arbeit eindeutige Effekte auf die scheinbar ruhende Mikroglia sowie auf die LPS-aktivierten Zellen. Ein Hauptbefund war die signifikante Reduktion der Genexpression (mRNA) der untersuchten proinflammatorischen Zytokine und entzündungsassoziierten Enzyme im Vergleich zu den LPS-aktivierten Zellen. Dagegen steigerte PYC die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 in Abhängigkeit von der Stimulationszeit. Interessanterweise beeinflusste PYC die Zellviabilität positiv und induzierte eine morphologische Wandlung der Mikroglia.

5.1.2 Grenzen des *in-vitro*-Modells

Mit Hilfe des Zellkulturmodells sollte der Einfluss von PYC auf Mikroglia unter weitestgehend kontrollierten Bedingungen untersucht werden. Da die primäre Rattenmikroglia oftmals tatsächlich an *in-vivo*-Prozessen beteiligt ist, liefern die Versuchsergebnisse relativ verlässliche Hinweise auf eine mögliche Wirkweise von PYC im ZNS. Dennoch stellen Kulturversuche im Allgemeinen eine deutliche Vereinfachung der komplexen Abläufe von Immunreaktionen dar. Bereits die Gewinnung, Aussaat und Kultivierung der Mikroglia stellt einen Reiz dar, der die unstimulierten Zellen in einen Zustand erhöhter Aktivität versetzt. Weiterhin berücksichtigt die isolierte Mikroglia- Zellkultur nicht die Interaktion mit anderen Zellen des ZNS wie beispielsweise Astrozyten oder Neuronen (Glass et al. 2010). Mikrogliazellen werden zudem stark von ihrer Umgebung beeinflusst und weisen in Kultur unterschiedliche Genexpressionsmuster als *in vivo* auf (Schmid et al. 2009). Weiterhin führt die Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch Mikroglia *in vivo* zu einer gesteigerten Permeabilität der BHS und in der zur Infiltration peripherer Immunzellen, welche wiederum die Mikrogliafunktionen beeinflussen (da Fonseca et al. 2014). Dieser Zusammenhang bleibt in der vorliegenden Arbeit unberücksichtigt. Dennoch liefern die Ergebnisse aus dem vorliegenden *in-vitro*- Modell wichtige Hinweise auf die molekulare Wirkweise von PYC sowie dessen antiinflammatorisches und somit potentiell neuroprotektives Potential.

5.2 Einfluss von PYC auf primäre Mikroglia

5.2.1 PYC steigert die Zellviabilität primärer Mikroglia

Zunächst wurden Experimente zur Zellviabilität PYC-stimulierter Mikroglia durchgeführt. Hierbei wurde *in vitro* keine zytotoxische Wirkung von PYC allein in einer Konzentration von 10, 25, 50 und 100µg/ml und in Kombination mit 5ng/ml LPS auf die Zellen festgestellt. Dies steht im Einklang mit einer Studie an der Mäuse-Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7, bei denen sich ebenfalls kein negativer Einfluss von PYC in einer Konzentration von 10-100µg/ml auf die Zellviabilität zeigte (Wu et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit hatte PYC in einer Konzentration von 10µg/ml PYC keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität, während es für die Konzentrationen von 25, 50 und 100µg/ml interessanterweise sogar zu einem Anstieg der Zellviabilität kam. Bei kombinierter Stimulation mit PYC und LPS reduzierte LPS den PYC-induzierten Anstieg der Zellviabilität, die Werte fielen allerdings nicht unter das Niveau der Kontrollen. Für alle folgenden Versuche wurde PYC in einer Konzentration von 25µg/ml verwendet, da es in dieser Konzentration sowohl bei alleiniger Stimulation mit PYC als auch mit LPS zu einem signifikanten Anstieg der Zellviabilität kam. Bereits in dieser moderaten Dosierung führte PYC zu einer Dämpfung der inflammatorischen Aktivität der Mikrogliazellen auf mRNA-Ebene. Ein Anstieg der Zellviabilität spricht zudem für eine erhöhte Anzahl vitaler Zellen und somit für eine Zellproliferation. In einer Studie von Lalancette-Hébert et al. 2007 führte die Entfernung proliferierender Mikroglia bei ischämischen Hirnverletzungen im Maus-Modell zur Verstärkung der proinflammatorischen Reaktion und einem vermehrten Untergang von Neuronen. Im Gegensatz zu dem potentiell neurotoxischen, klassisch-aktivierten Mikroglia-Phänotypen wurde den proliferierenden Mikrogliazellen in der betreffenden Studie eher ein neuroprotektives Potential zugeschrieben, da sie einen endogenen Pool neurotrophischer Moleküle wie IGF-1 darstellten und antiapoptotische Faktoren sezernierten (Lalancette-Hébert et al. 2007). Im Einklang mit diesen Ergebnissen spricht die PYC-induzierte Zellproliferation sowie die signifikante Reduktion der mRNA-Menge aller untersuchten Entzündungsmediatoren in der vorliegenden Arbeit für eine eher neuroprotektive Mikroglia-Transformation sowohl nach Stimulation mit PYC allein als auch in Kombination mit LPS. Dagegen kam es zu einer vermehrten Freisetzung von TNF- α , IL-6 auf Proteinebene sowie NO in den Zellkulturüberstand. Auch diese Befunde können auf eine PYC-induzierte Zellproliferation zurückzuführen sein und sollen im Folgenden näher diskutiert werden.

5.2.2 PYC beeinflusst die Morphologie primärer Mikroglia

PYC induziert morphologische Veränderungen in unstimulierter und LPS-aktivierter Mikroglia. Mikrogliazellen sind morphologisch-dynamische Zellen, deren äußere Form mit ihren funktionellen Aktivitäten assoziiert ist. Die von Kreutzberg et al. beschriebene stufenweise Aktivierung der Mikroglia von den scheinbar ruhenden, ramifizierten Zellen über eine Retraktion ihrer Fortsätze hin zu vollaktivierten, amöboiden, phagozytotisch tätigen Mikrogliazellen, wird heute allerdings differenzierter betrachtet (Kreutzberg 1996). So lässt sich die phänotypische Merkmalsausprägung wohl eher anhand des Expressionsprofils und weniger anhand der Zellmorphologie festmachen, da Mikrogliazellen im Laufe von Immunreaktionen diverse Aktivierungsstadien annehmen und beispielsweise aktivierte Mikrogliazellen vom M1 und M2-Typ ganz unterschiedliche Funktionen ausüben können (Cherry et al. 2014, Ransohoff & Perry 2009). Da die Bedingungen der kultivierten Zellen stets von dem komplexen Mikromilieu des ZNS abweichen, sind der Aussagekraft einer morphologischen Beurteilung der Zellen in Kultur Grenzen gesetzt. Dennoch lässt die lichtmikroskopische Untersuchung der Coomassie-gefärbten Mikroglia in dieser Arbeit Rückschlüsse auf den Zustand der Zellen zu. Die unstimulierten Mikrogliazellen wiesen nach 48 Stunden Ramifikationen und kleine Zellsomata auf. Dies entspricht weitestgehend der in zahlreichen Studien beschriebenen, ruhenden Zustandsform, während die LPS-aktivierten Zellen eher amöboid und vergrößert waren und somit eine M1-Transformation zeigten, die dem allgemeinen Konsens entsprechend auch in der vorliegenden Arbeit mit einem gesteigerten inflammatorischen Potential auf molekularbiologischer Ebene einherging (Olah et al. 2011). Die mit PYC sowie die mit PYC und LPS stimulierten Zellen zeigten analog zu den Ergebnissen zur Bestimmung der Zellviabilität keine Anzeichen für eine Schädigung und die Zelldichte schien zuzunehmen. Die mit PYC allein stimulierten Zellen waren länglich und wiesen deutliche Zellausläufer auf. Eine ähnliche Mikroglia wurde in einer aktuellen Studie näher untersucht. Hierzu entwickelte die Arbeitsgruppe Tam & Ma et al. ein *in-vitro*-Zellkulturmodell um eine bipolare, stäbchenförmige, stark proliferierende Mikroglia weiter zu charakterisieren, die scheinbar eine wichtige Rolle während der initialen Wiederherstellungsphase nach Verletzungen des ZNS spielte. Die untersuchte Mikroglia schien eine wichtige Rolle bei den Reparaturprozessen einzunehmen und exprimierte weniger proinflammatorische Zytokine TNF- α und IL-1 β . Zusätzlich kam es durch vermehrte Produktion der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β und zu einem Überwiegen

der neuroprotektiven Faktoren (Tam & Ma 2014). Damit übereinstimmend ergab sich in der vorliegenden Arbeit für die mit PYC allein stimulierten Zellen trotz eines morphologischen Wandels keine gesteigerte mRNA- und Proteinmenge pro-inflammatorischer Mediatoren im Vergleich zu den Kontrollen. In der Studie von Tam & Ma et al. kam es nach Stimulation mit LPS zu einer Umwandlung der bipolaren, länglichen Zellen zu amöboiden, vergrößerten M1-Mikroglia mit gesteigerter mRNA-Expression von TNF, IL-1 β und Jak1 und Stat3. Auch in der vorliegenden Arbeit ähnelten die mit PYC und LPS simultan stimulierten Zellen morphologisch der LPS-aktivierten Zustandsform. Interessanterweise war die mRNA-Menge der untersuchten Entzündungsmediatoren signifikant geringer als bei den mit LPS allein stimulierten Zellen. PYC verhindert also scheinbar die klassische M1-Transformation. Allerdings stieg gleichzeitig die Proteinmenge von TNF- α und IL-1 β sowie NO im Zellkulturüberstand. Da letztere Befunde von der Zellzahl unabhängig sind, könnte dies ein weiteres Indiz für die Proliferation der Mikroglia sein.

5.2.3 PYC senkt die mRNA-Menge von Entzündungsmediatoren in primärer Mikroglia nach LPS-Stimulation

Mikroglia-vermittelte Neuroinflammation gilt als Schlüsselfaktor bei der Pathogenese des IPS. So konnten im *in-vivo*-Modell nach Injektion von LPS Mikroglia-vermittelte toxische Effekte auf dopaminerge Neurone festgestellt werden. Die LPS-vermittelte Zytotoxizität wird dabei vor allem durch die von den klassisch aktivierten Mikrogliazellen freigesetzten proinflammatorischen zytotoxischen Faktoren vermittelt (Liu & Bing 2011). In der vorliegenden Dissertation erfolgte die molekularbiologische Untersuchung des Einflusses von PYC auf die Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 sowie der entzündungsassoziierten Enzyme COX-2, MMP-9 und iNOS in unstimulierter und LPS-aktivierter Mikroglia zunächst auf mRNA-Ebene. PYC reduzierte die mRNA-Menge von TNF, IL-1 β und IL-6 in Abhängigkeit von der Stimulationszeit signifikant. TNF- α spielt eine wichtige Rolle bei der Steuerung inflammatorischer Prozesse und wirkt über eine vermehrte Aktivierung von Caspase 1, Caspase 3, TNF-Rezeptor1 (TNF-1) oder p55 pro-apoptotisch (Mogi et al. 2000). *In vivo* konnte durch Inhibition von TNF- α die durch das Neurotoxin 6-OHDA induzierte Degeneration dopaminerger Neurone um 50% gesenkt werden (McCoy et al. 2006). In einer weiteren Studie führte die Injektion eines TNF- α -exprimierenden Adenovektors in die *Substantia Nigra* adulter Ratten zu einer chronischen TNF- α -Exposition und in der Folge zur Degeneration dopaminerger Neurone, Bewegungsstörungen und einer

Mikroglia-Aktivierung (DeLellaEzcurra et al. 2010). Ähnliche Befunde existieren für IL-1 β nach 60-tägiger Administration eines rekombinanten IL-1 β -exprimierenden Adenovirus (Ferrari et al. 2006). Weiterhin zeigen epidemiologische Studien, dass erhöhte IL-6-Serumwerte mit einem erhöhten Risiko einhergehen, an Parkinson zu erkranken (Chen et al. 2008). Dementsprechend kann PYC über die Reduktion der mRNA-Menge dieser Zytokine einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt für das IPS darstellen. Weiterhin kommt es über die Hochregulierung pro-inflammatorischer Zytokine zur Induktion entzündungsassoziierter Enzyme wie COX-2 oder MMP-9. Eine gesteigerte COX-2-Expression und die vermehrte Synthese von PG-E₂ sind mit der Pathogenese des IPS assoziiert. Bei der Synthese von PG durch COX-2 kommt es über eine Freisetzung von Elektronen zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und somit zur Generierung von oxidativem Stress. Über die Oxidation von Dopamin kann es beim IPS zu Veränderungen von Proteinfunktionen und zum Zelltod kommen (Teismann 2012). In der vorliegenden Arbeit reduzierte PYC die mRNA-Expression von COX-2 im LPS-induzierten Parkinsonmodell signifikant. Dieser Effekt war auch in einer *ex-vivo*-Studie zu beobachten, in welcher die antiinflammatorische Wirkung von PYC auf polymorphkernige Leukozyten untersucht wurde. Zunächst wurden diese aus dem Blut gesunder Probanden vor und nach fünftägiger Einnahme von PYC isoliert und anschließend mit LPS und Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) stimuliert, um eine Synthese von Leukotrienen, Thromboxan und PG aus Arachidonsäure zu induzieren. PYC inhibierte in der beschriebenen Studie die Genexpression der 5-Lipoxygenase (5-LOX) sowie der COX-2 (Canali et al. 2009). Anhand von *in-vivo*-Untersuchungen am MPTP-induzierten Parkinson-Modell konnte PYC das Proteinlevel von COX-2 im striatalen Gewebe deutlich reduzieren (Khan et al. 2013). MMP-9 ist ein Enzym, welches an der Degradation von Zellmatrixbestandteilen beteiligt ist, im Rahmen von Entzündungsreaktionen vermehrt exprimiert wird und mit der Pathogenese chronisch-entzündlicher Erkrankungen assoziiert ist. In der vorliegenden *in-vitro* Untersuchung reduzierte PYC die mRNA-Expression von MMP-9 nach 3, 6 und 24 Stunden signifikant. Eine weitere Studie bestätigte diesen Effekt auch in einer *ex-vivo*-Untersuchung humaner Plasmaproben vor und nach Einnahme von PYC. In dieser Studie konnte die mittels ELISA bestimmte LPS-induzierte MMP-9-Konzentration im Plasma durch PYC um 25% gesenkt werden, wobei die Reduktion individuell unterschiedlich 4,6 bis 39% betrug (Grimm et al. 2006). Der anti-inflammatorische Effekt von PYC konnte sich also auch unter Berücksichtigung von Absorption und

Verstoffwechselung des Pflanzenextraktes PYC bestätigen und ist gemäß den Ergebnissen dieser Arbeit vermutlich auf dessen Einfluss auf Immunzellen wie Mikroglia zurückzuführen.

5.2.4 PYC beeinflusst die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine

Nachdem PYC auf mRNA-Ebene die untersuchten Entzündungsmediatoren signifikant reduzieren konnte, erfolgte die Proteinbestimmung von IL-6 und TNF- α mittels ELISA. Für IL-6 ergab sich nach 3 Stunden zunächst auf Proteinebene eine signifikante Reduktion der Proteinmenge im Zellkulturüberstand; nach 6 Stunden zeigte sich kein Einfluss und nach 24 Stunden kam es zu einem signifikanten Anstieg der IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand. Diese Ergebnisse implizieren eine in Abhängigkeit von der Stimulationszeit unterschiedliche Wirkungsweise von PYC auf die IL-6-Freisetzung. Interessanterweise ergab sich im Gegensatz zu der vermehrten Freisetzung von IL-6 in den Zellkulturüberstand nach 24 Stunden eine Reduktion der mRNA-Menge für IL-6 nach 3, 6 und 24 Stunden und war nach 24 Stunden sogar am deutlichsten. Diese Ergebnisse könnten sich mit der Proliferation der Mikroglia erklären lassen. Zudem handelt es sich bei IL-6 um ein pleiotropes Zytokin sowohl mit pro-, als auch anti-inflammatorischen Eigenschaften und sehr komplexer Wirkungsweise. Verschiedene Mausmodelle konnten zeigen, dass durch den klassischen IL-6-Signalweg vor allem anti-inflammatorische Signale auf die entsprechenden Zielzellen vermittelt werden. So kommt es zum Beispiel zur Aktivierung von STAT-3-Proteinen, die eine wichtige Rolle bei der Regeneration intestinaler Epithelzellen spielen, indem sie eine Proliferation fördern und Apoptose inhibieren. Im Gegensatz kommt es bei chronisch inflammatorischen Erkrankungen wie *Morbus Crohn* oder rheumatoider Arthritis zur vermehrten Aktivierung des alternativen Signalwegs und zur Initiation einer starken Immunantwort (Scheller et al. 2011). Die vorliegenden Versuchsergebnisse sprechen eher für eine Aktivierung des klassischen Signalweges durch PYC, da es zu einer Proliferation kam und die Zellen auch keine Anzeichen von Apoptose zeigten, sondern die Zellviabilität sogar zunahm. Eine wichtige Rolle scheint auch die Stimulationszeit zu spielen, da sich die Erhöhung von IL-6 im Zellkulturüberstand erst nach 24 Stunden ereignete.

Für TNF- α ergab sich nach allen Stimulationszeiten ein Anstieg der Konzentration im Zellkulturüberstand, während die mRNA-Expression abnahm. Dies spricht wiederum für eine erhöhte Anzahl TNF- α -sezernierender Zellen und ist ebenso ein Indiz für eine Zellproliferation. PYC ist bekannt für seine Fähigkeit, oxygenabhängige Todesmechanismen abzuschwächen und für sein anti-inflammatorisches Potential. Gleichzeitig schien PYC in

einer Studie an einer J774 Makrophage-Zelllinie nicht immunsupprimierend zu wirken, da es die TNF- α und IL-1 β -Sekretion sowie die Phagozytoseleistung steigerte. Ähnlich wie in der vorliegenden Studie kam es zu einer Vergrößerung der Zellsomata, was für eine Aktivierung der Makrophagen spricht. Shah et al. vermuten, dass die neuroprotektive Wirkung von PYC nicht auf einer Suppression, sondern auf einer Modulation der Immunantwort beruhe (Shah et al. 2002). Dagegen reduzierte PYC in einer *in-vivo*-Studie anhand eines MPTP-induzierten Parkinson-Modells die Freisetzung von TNF- α und IL-1 β im striatalen Gewebe (Khan et al. 2013). Eine Erklärung für diese gegensätzlichen Ergebnisse kann eine unterschiedliche Wirkung von PYC *in vivo* und *in vitro* sein. In jedem Fall sind weitere Studien erforderlich, um die molekulare Wirkung dieses Pflanzenextraktes auf die Freisetzung von Entzündungsmediatoren zu definieren.

5.2.5 PYC steigert die Freisetzung von NO unabhängig von der induzierbaren NO-Synthase (iNOS)

Zahlreiche Studien betonen die wichtige Rolle von nitrosativem Stress bei der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wie dem IPS (Hunot et al. 1996, Pacher et al. 2007, Tsang & Chung 2009). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit neben den verschiedenen Entzündungsmediatoren auch die Freisetzung des NO-Moleküls durch Mikroglia sowie die Expression der iNOS untersucht, welche insbesondere in Folge von Immun- und Entzündungsreaktionen vermehrt induziert wird. Mit PYC kam es nach 6 Stunden tendenziell und nach 24 Stunden zu einer signifikanten Steigerung der LPS-induzierten NO-Freisetzung in den Zellkulturüberstand um 26%, während die mRNA-Expression der iNOS interessanterweise gleichzeitig um 6,5% abnahm. PYC steigert also die NO-Freisetzung in den Zellkulturüberstand scheinbar unabhängig von der iNOS. Neben der iNOS, die vermehrt im Rahmen von Immun- und Entzündungsreaktionen exprimiert wird, können auch die konstitutiv exprimierten durch Erhöhung der Calciumkonzentration aktivierten eNOS und nNOS an der NO-Freisetzung beteiligt sein. Dafür spricht, dass verschiedene Studien von einem vasodilatatorischen, blutdrucksenkenden Potential von PYC berichten, welches auf eine gesteigerte Aktivierung der eNOS zurückgeführt wird (Nishioka et al. 2007). Es ist also auch denkbar, dass PYC die NO-Produktion über eine Aktivierung der eNOS oder der nNOS steigert. Ob diese konstitutiv exprimierten NOS-Formen allerdings in Mikroglia exprimiert werden, wird aus der aktuellen Studienlage nicht ersichtlich und kann Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Weiterhin ist NO Bestandteil des sogenannten NO/ONOO⁻-Zyklus, bei

dem es sich nach einer Theorie von Martin Pall um einen lokal wirkenden, biochemischen Teufelskreis handelt, der an der Pathogenese verschiedenster degenerativer Erkrankungen beteiligt ist (Pall 2007). Im Zentrum des NO/ONOO⁻-Zyklus steht die Reaktion der freien Radikale Stickoxid (\bullet NO) und Superoxid ($O_2\bullet^-$) zu Peroxynitrit (ONOO⁻). Dabei vermittelt insbesondere das hoch reaktive Peroxynitrit (ONNO⁻) die NO-assoziierte Zytotoxizität. ONOO⁻ erzeugt oxidativen Stress, indem es Lipide, DNA und Proteine oxidiert, was zu Einschränkungen in der Signalvermittlung bis hin zu Nekrose und Apoptose führen kann (Pacher et al. 2007). Nach Palls Ansicht ist dabei vor allem das reziproke Verhältnis zwischen dem Anstieg von ONOO⁻ und der Verarmung der Verbindung Tetrahydrobiopterin (BH₄) entscheidend (Pall 2007). Demnach oxidiert ONOO⁻ BH₄, was zu einer BH₄-Verarmung führt. Da BH₄ einen Cofaktor für die NOS darstellt, kommt es statt zur NO-Synthese zur vermehrten Bildung von O_2^- , welches mit dem NO der nicht entkoppelten NOS in einer schnellen Reaktion zu ONOO⁻ reagiert und zu einer gesteigerten hypoxischen Schädigung von Neuronen im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen wie dem IPS oder *Morbus Alzheimer* führt (Delgado-Esteban et al. 2002, Foxton et al. 2007). Die zur Gruppe der Flavenoide gehörenden oligomeren Procyanidine (OPC) machen mit 65-75% den größten Anteil von PYC aus und wirken bedingt durch ihre aromatische Grundstruktur als Radikalfänger von \bullet NO, $O_2\bullet^-$ sowie ONOO⁻ (D'Andrea 2010). In der vorliegenden Arbeit induzierte PYC eine gesteigerte NO-Freisetzung durch LPS-aktivierte Mikroglia, bei gleichzeitiger Reduktion der mRNA-Expression der iNOS. Dies kann durch ein Abfangen von ONNO⁻-Radikalen durch PYC und somit einer gesteigerten Verfügbarkeit des Cofaktors BH₄ für die iNOS bedingt sein. Es kommt also nicht zu einer vermehrten mRNA-Expression der iNOS, sondern eventuell zu einer vermehrten Aktivierung dieses Enzyms oder einer anderen NOS-Form mit gesteigerter NO-Produktion im Verhältnis zur $O_2\bullet^-$ -Produktion und in der Folge zu einer verringerten Neubildung von ONOO⁻. NO selbst ist im Verhältnis zu ONOO⁻ eher unreaktiv, weswegen die Verschiebung des Gleichgewichtes zu einer gesteigerten NO-Menge bei gleichzeitig reduzierten Anteil an ONOO⁻ potentiell neuroprotektiv sein kann.

5.2.6 PYC reduziert die Aktivierung von MAPK-Signalwegen in primärer Mikroglia nach LPS-Stimulation

Aufgrund seiner Proteinbindungsfähigkeit ist PYC weiterhin in der Lage in enzymatische Regulationsmechanismen einzugreifen (D'Andrea 2010, Packer et al. 1999). MAPK bilden solche Regulationskaskaden, die an der Pathogenese des IPS beteiligt sind, da sie eine Rolle

bei der Signaltransduktion im Rahmen entzündlicher Prozesse spielen und unter anderem die Apoptose dopaminerger Neurone induzieren können. Ausgelöst durch α -Synuclein, dem Hauptbestandteil der *Lewy*-Körperchen, kommt es zur Aktivierung von p38- und JNK-Signalkaskaden und in der Folge zur vermehrten Produktion von IL-1 β und TNF- α sowie IL-6, die eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen spielen. IL-6 führt wiederum selbst zur Aktivierung von MAPK. Über p38 kommt es über eine Phosphorylierung von p53 zu Apoptose, zudem aktiviert p38 die iNOS (Kim & Choi 2010). In einer Studie an humanen Chondrozyten reduzierte PYC die durch Uratkristalle verursachte Aktivierung des NF- κ B Signalweges sowie der JNK und p38 MAP-Kinasen (Peng et al. 2012). Im Einklang dazu reduzierte PYC in der vorliegenden Arbeit die LPS-induzierten Phosphorylierung von p38 um etwa 15%. Die Reduktion der mRNA-Menge der proinflammatorischen Zytokine kann dementsprechend auf die verminderte Aktivierung der p38-MAPK zurückzuführen sein. Weiterhin reduzierte PYC auch die ERK1/2 in den LPS-stimulierten Ansätzen ebenfalls um etwa 15%. ERK sind an der Regulation mitochondrialer Funktionen beteiligt und spielen eine zentrale Rolle bei der Pathogenese von Krebserkrankungen. Im Rahmen von ischämischen Hirnverletzungen kam es im *in-vivo*-Rattenmodell ebenfalls zu einer vermehrten Phosphorylierung von ERK1/2 und in der Folge zu einer Mikroglia-Aktivierung mit gesteigerter Freisetzung des Entzündungsmediators IL-1 β (Lu et al. 2007). Auch beim IPS sind phosphorylierte ERK erhöht, weswegen man davon ausgehen kann, dass sie ebenfalls eine Rolle bei der Pathogenese dieser Erkrankung spielen (Kim & Choi 2010). Zusammenfassend kann die in der vorliegenden Arbeit gezeigte reduzierte Phosphorylierung sowohl von p38 als auch von ERK1/2 ein weiterer Hinweis auf ein anti-inflammatorisches und somit neuroprotektives Potential von PYC sein. In der nachfolgenden Abbildung 15 sind die in dieser Arbeit untersuchten Parameter und Ergebnisse im Rahmen der Pathogenese des IPS dargestellt.

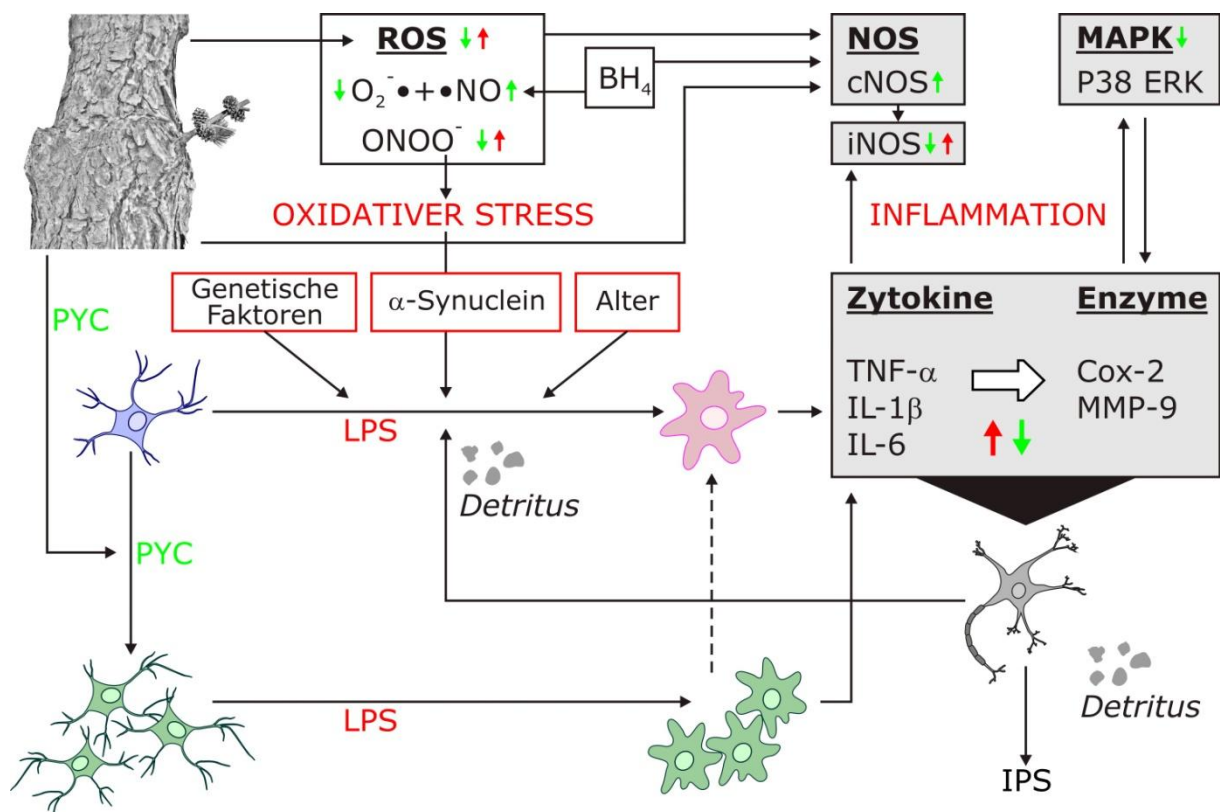


Abb. 15 Wirkung von PHYC auf LPS-aktivierte Mikrogliazellen im Rahmen der Pathogenese des IPS. Über verschiedene Faktoren wie Genetik, Alter, α -Synuclein-Aggregate oder das bakterielle Endotoxin LPS, kommt es zur klassischen Mikroglia-Aktivierung mit einer vermehrten Freisetzung von Entzündungsmediatoren (z.B. Zytokine, Enzyme) sowie einer Induktion entzündungsassoziierter Signalkaskaden (z.B. MAPK) und in der Folge zur Degeneration dopaminergischer Neurone beim IPS. Der anfallende Zelldetritus bewirkt eine weitere Aktivierung der Mikroglia und es kommt zu einer Art neuroinflammatorischen Teufelskreis. PHYC induziert eine antiinflammatorische Mikroglia-Transformation und gleichzeitig kommt es zur Proliferation. Bei simultaner Stimulation mit PHYC und LPS werden einige Zellen scheinbar klassisch aktiviert. Weiterhin reduziert PHYC die ROS und verringert somit die Entstehung von oxidativem Stress. Es kommt dabei vermutlich zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zu einer gesteigerten NO-Synthese bei gleichzeitig reduziertem Anteil des neurotoxischen ONOO^- und somit vermutlich zur Neuroprotektion.

5.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Mit Veränderung der Altersstruktur ist mit einem stetigen Anstieg der neurodegenerativen Erkrankungen wie dem IPS zu rechnen, was mit einer zunehmenden wirtschaftlichen und sozialen Belastung sowohl der Betroffenen als auch der Gesellschaft einhergeht. Bis heute stehen für das IPS ausschließlich symptomatische Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung. Da beim Auftreten der IPS-assoziierten Symptome bereits 60% der dopaminergen Neurone degeneriert sind, muss der Fokus der Therapieentwicklung auf einer Ursachenbekämpfung dieser Erkrankung liegen. Basierend auf der Annahme einer Reduktion der mit großer Wahrscheinlichkeit an der initialen Pathogenese des IPS beteiligten inflammatorischen und oxidativen Prozesse durch flavenoidreiche Pflanzenextrakte, wurde in dieser *in-vitro*-Studie

die Wirkung von PYC auf LPS-stimulierte Mikrogliazellen untersucht. Ein Hauptbefund ist die signifikante Reduktion der LPS-induzierten mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 sowie der entzündungsassoziierten Enzyme COX-2, MMP-9. Im Gegensatz dazu kam es zu einem Anstieg von IL-6 und TNF- α im Zellkulturüberstand in Abhängigkeit von der Stimulationszeit. Dieser scheinbare Widerspruch kann sich mit der in dieser Arbeit erstmals gezeigten gesteigerten Zellviabilität durch die Stimulation mit PYC erklären lassen. Ein Anstieg der Zellviabilität sowie die scheinbare Zunahme der Zelldichte der mittels Coomassie-Blau gefärbten PYC-stimulierten Mikroglia sprechen für eine Zellproliferation und somit für eine gesteigerte Anzahl an Zellen, die zur Proteinfreisetzung beitragen. Proliferierenden Mikrogliazellen wurde in verschiedenen Studien ein eher neuroprotektiver Phänotyp zugesprochen. Ein weiterer interessanter Befund dieser Arbeit ist die Steigerung der NO-Freisetzung bei simultaner Stimulation mit PYC und LPS während es gleichzeitig zu einer Abnahme der iNOS-mRNA kam. Demnach erfolgte die gesteigerte NO-Synthese vermutlich unabhängig von der mit übermäßigen Immun- und Entzündungsreaktionen assoziierten iNOS. Es ist also denkbar, dass die gesteigerte NO-Menge auf eine vermehrte Aktivierung konstitutiv exprimierter NOS zurückzuführen ist. Aus der aktuellen Forschungslage wird allerdings nicht ersichtlich, ob diese NOS-Formen in Mikrogliazellen vorkommen. Dies kannm Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. PYC ist insbesondere bekannt für sein antioxidatives Potential, da es sich bei den zu etwa 70% enthaltenen OPC um effektive Radikalfänger handelt. Neben NO zählen O₂⁻ sowie ONOO⁻ zu den Sauerstoffradikalen, wobei es insbesondere durch ONOO⁻ zur oxidativen Schädigung von DNA und Proteinen und somit zur Vermittlung von oxidativem Stress kommt. Interessanterweise oxidiert ONOO⁻ BH₄, einen Cofaktor der NOS. Es ist also denkbar, dass die in PYC enthaltenen OPC die ONOO⁻-Radikale abfangen und auf diese Weise das BH₄-Angebot und somit die NO-Synthese steigen. In diesem Fall sind die Ergebnisse dieser Arbeit Ausdruck einer Verschiebung des Gleichgewichtes von dem hoch reaktiven ONOO⁻-Radikal zu dem eher unreaktiven NO-Molekül und somit zur Reduktion des oxidativen Stresses. Sollte sich diese Hypothese in weiteren Untersuchungen bestätigen, ist dies ein ganz neuer Ansatzpunkt zur Reduktion von oxidativem Stress im Rahmen der Pathogenese des IPS. Außerdem konnte PYC die Phosphorylierung der MAPK p38 und ERK reduzieren und somit die inflammationsassoziierte Signaltransduktion hemmen. Insgesamt sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit für eine PYC-induzierte Mikrogliastransformation, die sich vermutlich

vorteilhaft im Rahmen der Pathogenese des IPS auswirkt. Bemerkenswert ist, dass es zu keiner reinen Immunsuppression, sondern zu einer Modulation der Mikroglia-vermittelten Immunantwort kommt. Allerdings bestehen Grenzen dieses *in-vitro*-Modells, da bereits die Kultivierung der Mikroglia einen Reiz für die Zellen darstellt. Zudem bleiben Interaktionen mit anderen Zellen und der Umgebung unberücksichtigt. So führt die Freisetzung von Entzündungsmediatoren *in vivo* zu einer gesteigerten Permeabilität der BHS mit nachfolgender Infiltration peripherer Leukozyten. Gleichwohl liefern die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse wichtige Hinweise auf die molekulare Wirkweise von PYC und können als Grundlage für weitere Zellkulturmodelle mit verschiedenen interagierenden Zelltypen dienen und sollten *in vivo* validiert werden. Durch seine immunmodulatorischen Eigenschaften stellt PYC einen vielversprechenden neuroprotektiven Therapieansatz für das IPS dar.

6. Zusammenfassung

Die altersassoziierten neurodegenerativen Erkrankungen werden im Zuge des demografischen Wandels zunehmen. Beim Idiopathische Parkinson Syndrom (IPS) kommt es in Folge einer Degeneration dopaminerger Neurone zu charakteristischen motorischen Symptomen; fakultativ können nichtmotorische Begleitsymptome auftreten. Trotz großen Leidensdrucks für die Betroffenen gibt es bisher nur symptomatische Therapiemöglichkeiten. Die Ursachen für die Entstehung des IPS sind multifaktoriell und nicht abschließend geklärt; vermutlich spielen aber oxidativer Stress und Neuroinflammation eine wichtige Rolle. Induziert durch α -Synucleinaggregate, in Folge von Alterungsprozessen oder genetischen Defekten, kommt es über eine gesteigerte klassische Aktivierung von Mikrogliazellen, den Makrophagen des ZNS, zur Vermittlung von Immun- und Entzündungsreaktionen. Vor diesem Hintergrund können antiinflammatorisch und antioxidativ-wirksame Präparate, wie der flavenoidreiche Pflanzenextrakt Pycnogenol® (PYC) aus der Rinde französischer Meereskiefern, eine Möglichkeit zur Prävention und zur kausalen Therapie des IPS darstellen. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Untersuchung der Wirkung von PYC *in vitro* auf etablierte, primäre Rattenmikroglia-Kulturen. Durch Stimulation mit LPS wurde die Mikroglia aktiviert und die inflammatorische Komponente des IPS experimentell rekonstruiert. Mittels MTT-Test konnten zytotoxische Effekte von PYC auf Mikroglia ausgeschlossen werden. In einer Konzentration von 25 μ g/ml kam es sowohl mit PYC allein

als auch in Kombination mit LPS sogar zu einer gesteigerten Zellviabilität, was für eine Proliferation sprechen kann. Auch bei lichtmikroskopischer Begutachtung der Coomassie-Blau-gefärbten Mikroglia zeigten sich die Zellen vital und die Zelldichte schien zuzunehmen. Weiterhin reduzierte PYC die mittels RT-qPCR bestimmte mRNA-Menge der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-1 β sowie der entzündungsassoziierten Enzyme MMP-9 und COX-2 in LPS-stimulierter Mikroglia nach 3, 6 und 24 Stunden signifikant. Gleichzeitig kam es für TNF- α bei simultaner Stimulation mit PYC und LPS zu einer Steigerung der mittels ELISA bestimmten Proteinfreisetzung in den Zellkulturüberstand, was ein weiteres Indiz für die Proliferation ist. Für IL-6 ergab sich dagegen ein in Abhängigkeit von der Stimulationszeit unterschiedlicher Verlauf der Proteinfreisetzung. In jedem Fall kommt es durch PYC zu keiner reinen Suppression, sondern zu einer Modulation der Mikroglia-vermittelten Immunantwort. Des Weiteren steigerte PYC die LPS-induzierte Freisetzung des NO-Moleküls nach 6 und 24 Stunden scheinbar unabhängig von der iNOS, da es zu einer gleichzeitigen Abnahme der iNOS-mRNA kam. PYC reduzierte die mittels Western-Blot-Analyse bestimmte Phosphorylierung der zu den MAPK gehörenden ERK und p38, die maßgeblich an der Signaltransduktion im Rahmen entzündlicher Prozesse beteiligt sind um je etwa 15%. Insgesamt weisen die Ergebnisse dieser Arbeit auf ein neuroprotektives Potential von PYC auf molekularbiologischer Ebene hin.

Literaturverzeichnis

- Akira S, Hirano, T, Tetsuya, T, Kishimoto T. 1990. Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL1 and TNF). *FASEB J* 4 (11):2860–67
- Bartels AL, Leenders KL. 2010. Cyclooxygenase and neuroinflammation in Parkinson's disease neurodegeneration. *Curr Neuroparmacol* 8 (1):62–68
- Beecher GR. 2015. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr* 133 (10):3248–54
- Bogdan C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2 (10):907–16
- Canali R, Comitato R, Schonlau F, Virgili F. 2009. The anti-inflammatory pharmacology of Pycnogenol in humans involves COX-2 and 5-LOX mRNA expression in leukocytes. *Int Immunopharmacol* 9 (10):1145–49
- Ceballos-Baumann A, Conrad B. 2005. *Bewegungsstörungen*: Thieme Verlag, Stuttgart
- Cesarone MR. 2005. Prevention of Edema in Long Flights with Pycnogenol(R). *Clin Appl Thromb Hemost* 11 (3):289–94
- Cesarone MR, Stuard S, Schönlau F, Di Renzo A, Grossi MG, Dugall M, Cornelli U, Cacchio M, Gizzi G, Pellegrini L. 2010. Kidney flow and function in hypertension: protective effects of pycnogenol in hypertensive participants--a controlled study. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 15 (1):41–46
- Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. 2007. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev* 53 (2):344–54
- Chen H, O'Reilly EJ, Schwarzschild MA, Ascherio A. 2008. Peripheral inflammatory biomarkers and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* 167 (1):90–95
- Chen H, Zhang SM, Hernán MA, Schwarzschild MA, Willett WC, Colditz GA, Speizer FE, Ascherio A. 2003. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Arch Neurol* 60 (8):1059–64
- Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. 2014. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation* 11 (98):1–15
- da Fonseca A, Matias D, Garcia C, Amaral R, Geraldo LH, Freitas C, Lima, F. R. S. 2014. The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Front Cell Neurosci* 8 (362):1–13
- D'Andrea G. 2010. Pycnogenol: a blend of procyanidins with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia* 81 (7):724–36

- Dawson TM, Dawson VL. 2003. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 302 (5646):819–22
- deLau L, Breteler M. 2006. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 5 (6):525–35
- DeLellaEzcurra A, Chertoff M, Ferrari C, Graciarena M, Pitossi F. 2010. Chronic expression of low levels of tumor necrosis factor-alpha in the substantia nigra elicits progressive neurodegeneration, delayed motor symptoms and microglia/macrophage activation. *Neurobiol Dis* 37 (3):630–40
- Delgado-Esteban M, Almeida A, Medina JM. 2002. Tetrahydrobiopterin deficiency increases neuronal vulnerability to hypoxia. *J Neurochem* 82 (5):1148–59
- Deutsche Gesellschaft für Neurologie. 2012. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Parkinson-Syndrome - Diagnostik und Therapie. *Thieme Verlag, Stuttgart*
- Dutta G, Zhang P, Liu B. 2008. The lipopolysaccharide Parkinson's disease animal model: mechanistic studies and drug discovery. *Fundam Clin Pharmacol* 22 (5):453–64
- Enseleit F, Sudano I, Périat D, Winnik S, Wolfrum M, Flammer AJ, Fröhlich GM, Kaiser P, Hirt A, Haile SR, Krasniqi N, Matter CM, Uhlenhut K, Högger P, Neidhart M, Lüscher TF, Ruschitzka F, Noll G. 2012. Effects of Pycnogenol on endothelial function in patients with stable coronary artery disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled, cross-over study. *Eur Heart J* 33 (13):1589–97
- Esposito E, DiMatteo V, Benigno A, Pierucci M, Crescimanno G, Di Giovanni G. 2007. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 205 (2):295–312
- Ezzikouri S, Nishimura T, Kohara M, Benjelloun S, Kino Y, Inoue K, Matsumori A, Tsukiyama-Kohara K. 2015. Inhibitory effects of Pycnogenol® on hepatitis C virus replication. *Antiviral Res* 113:93–102
- Ferrari CC, Pott Godoy MC, Tarelli R, Chertoff M, Depino AM, Pitossi FJ. 2006. Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1beta in the substantia nigra. *Neurobiol Dis* 24 (1):183–93
- Flood P, Qian L, Peterson LJ, Zhang F, Shi J, Gao H, Hong J. 2011. Transcriptional Factor NF-κB as a Target for Therapy in Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis* 2011 (216298):1–8
- Förstermann U, Sessa WC. 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33 (7):829–37
- Foxton RH, Land JM, Heales, S. J. R. 2007. Tetrahydrobiopterin availability in Parkinson's and Alzheimer's disease; potential pathogenic mechanisms. *Neurochem Res* 32 (4-5):751–56

- Furchgott RF, Zawadzki JV. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288 (5789):373–76
- Gao X, Cassidy A, Schwarzschild MA, Rimm EB, Ascherio A. 2012. Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. *Neurology* 78 (15):1138–45
- Gao X, Chen H, Schwarzschild MA, Ascherio A. 2011. Use of ibuprofen and risk of Parkinson disease. *Neurology* 76 (10):863–69
- Gayle DA, Ling ZD, Tong CW, Landers T, Lipton JW, Carvey PM. 2002. Lipopolysaccharide (LPS)-induced dopamine cell loss in culture: roles of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and nitric oxide. *Dev Brain Res* 133 (1):27–35
- Gelb DJ, Oliver E, Gilman S. 1999. Diagnostic Criteria for Parkinson Disease. *Arch Neurol* 56 (1):33–39
- Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. 2010. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140 (6):918–34
- Golański J, Muchova J, Golański R. 2006. Does Pycnogenol Intensify the Efficiency of Acetylsalicylic Acid in the Inhibition of Platelet Function? In vitro experience. *Postepy Hig Med Dosw.* 60:316–21
- Grimm T, Chovanová Z, Muchová J, Sumegová K, Liptáková A, Duracková Z, Högger P. 2006. Inhibition of NF-kappaB activation and MMP-9 secretion by plasma of human volunteers after ingestion of maritime pine bark extract (Pycnogenol). *J Inflamm* 3 (1):1–6
- Heldt H, Piechulla B. 2015. *Pflanzenbiochemie*: Springer Verlag, Heidelberg
- Hickey P, Stacy M. 2011. Available and emerging treatments for Parkinson's disease: a review. *Drug Des Devel Ther* 5:241–54
- Hines DJ, Choi HB, Hines RM, Phillips AG, MacVicar BA. 2013. Prevention of LPS-induced microglia activation, cytokine production and sickness behavior with TLR4 receptor interfering peptides. *PLoS One* 8 (3):1–10
- Hirsch EC, Hunot S. 2009. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 8 (4):382–97
- Hirsch EC, Vyas S, Hunot S. 2012. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 18 (1):210–12
- Hung C, Chen Y, Hsieh W, Chiou S, Kao C. 2010. Ageing and neurodegenerative diseases. *Ageing Res Rev* 9 (1):36–46

- Hunot S, Boissière F, Faucheux B, Brugg B, Mouatt-Prigent A, Agid Y, Hirsch EC. 1996. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in parkinson's disease. *Neuroscience* 72 (2):355–63
- Hwang S, Shih P, Yen G. 2012. Neuroprotective effects of citrus flavonoids. *J Agric Food Chem* 60 (4):877–85
- Imamura K, Hishikawa N, Sawada M, Nagatsu T, Yoshida M, Hashizume Y. 2003. Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol* 106 (6):518–26
- Jones SA. 2005. Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6. *J Immunol* 175 (6):3463–68
- Kettenmann H, Hanisch U, Noda M, Verkhratsky A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91 (2):461–553
- Khan MM, Kempuraj D, Thangavel R, Zaheer A. 2013. Protection of MPTP-induced neuroinflammation and neurodegeneration by Pycnogenol. *Neurochem Int* 62 (4):379–88
- Kim EK, Choi E. 2010. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochem Biophys Acta* 1802 (4):396–405
- Kim SU, Vellis J de. 2005. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81 (3):302–13
- Knott C, Stern G, Wilkin GP. 2000. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Molecular and cellular neurosciences* 16 (6):724–39
- Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19 (8):312–18
- Lalancette-Hébert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J. 2007. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci* 27 (10):2596–605
- Liu M, Bing G. 2011. Lipopolysaccharide animal models for Parkinson's disease. *Parkinsons Dis* 2011 (327089):1–8
- Lu K, Cho C, Liang C, Chen S, Liliang P, Wang S, Chen H. 2007. Inhibition of the MEK/ERK pathway reduces microglial activation and interleukin-1-beta expression in spinal cord ischemia/reperfusion injury in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 133 (4):934–41
- McCoy MK, Martinez TN, Ruhn KA, Szymkowski DE, Smith CG, Botterman BR, Tansey KE, Tansey MG. 2006. Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-

- negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 26 (37):9365–75
- Mogi M, Harada M, Narabayashi H, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T. 1996. Interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor- α levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 211 (1):13–16
- Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, Ichinose H, Nagatsu T. 2000. Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from Parkinsonian brain. *J Neural Transm* 107 (3):335–41
- Mumenthaler M, Mattle H. 2008. *Neurologie*: Thieme Verlag, Stuttgart
- Nishioka K, Hidaka T, Nakamura S, Umemura T, Jitsuiki, D. Soga, J., Goto C, Chayama K, Yoshizumi M, Higashi Y. 2007. Pycnogenol, French maritime pine bark extract, augments endothelium-dependent vasodilation in humans. *Hypertens Res* 30 (9):775–80
- Olah M, Biber K, Vinet J, Boddeke HW. 2011. Microglia phenotype diversity. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 10 (1):108–18
- Olson JK, Miller SD. 2004. Microglia Initiate Central Nervous System Innate and Adaptive Immune Responses through Multiple TLRs. *J Immunol* 173 (6):3916–24
- Ousman SS, Kubes P. 2012. Immune surveillance in the central nervous system. *Nat Neurosci* 15 (8):1096–101
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87 (1):315–424
- Packer L, Rimbach G, Virgili F. 1999. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (pinus maritima) bark, pycnogenol. *Free Radic Biol Med* 27 (5-6):704–24
- Pall ML. 2007. Nitric oxide synthase partial uncoupling as a key switching mechanism for the NO/ONOO- cycle. *Med Hypotheses* 69 (4):821–25
- Pearson DA, Paglieroni TG, Rein D, Wun T, Schramm DD, Wang JF, Holt RR, Gosselin R, Schmitz HH, Keen CL. 2002. The effects of flavanol-rich cocoa and aspirin on ex vivo platelet function. *Thromb Res* 106 (4-5):191–97
- Peng YJ, Lee CH, Wang CC, Salter DM, Lee HS. 2012. Pycnogenol attenuates the inflammatory and nitrosative stress on joint inflammation induced by urate crystals. *Free Radic Biol Med* 52 (4):765–74

- Pessoa Rocha N, Silva de Miranda, A., Teixeira AL. 2015. Insights into Neuroinflammation in Parkinson's Disease: From Biomarkers to Anti-inflammatory Basd Therapies. *BioMed Res Int* 2015 (628192):1–12
- Ransohoff RM, Perry VH. 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27:119–45
- Rohdewald P. 2002. A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int J Clin Pharmacol Ther* 40 (4):158–68
- Rosenberg GA. 2009. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol* 8 (2):205–16
- Saijo K, Glass CK. 2011. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol* 11:775–87
- Schäfer A, Chovanová Z, Muchová J, Sumegová K, Liptáková A, Duracková Z, Högger P. 2006. Inhibition of COX-1 and COX-2 activity by plasma of human volunteers after ingestion of French maritime pine bark extract (Pycnogenol). *Biomed Pharmacother* 60 (1):5–9
- Schäfer A, Högger P. 2007. Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol) effectively inhibit alpha-glucosidase. *Diabetes Res Clin Pract* 77 (1):41–46
- Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochem Biophys Acta* 1813 (5):878–88
- Schmid CD, Melchior B, Masek K, Puntambekar SS, Danielson PE, Lo DD, Sutcliffe JG, Carson MJ. 2009. Differential gene expression in LPS/IFN γ activated microglia and macrophages: in vitro versus in vivo. *J Neurochem* 109 (6):117–25
- Shah V, Bayeta E, Lau B. 2002. Pycnogenol Augments Macrophage Phagocytosis and Cytokine Secretion. *Pak J Nutr* 5 (1):196–201
- Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. 2010. The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *Int J Cell Biol* 2010 (215158):1–21
- Steigerwalt R, Belcaro G, Cesarone MR, Di Renzo A, Grossi MG, Ricci A, Dugall M, Cacchio M, Schönla F. 2009. Pycnogenol improves microcirculation, retinal edema, and visual acuity in early diabetic retinopathy. *J Ocul Pharmacol Ther* 25 (6):537–40
- Steinert JR, Chernova T, Forsythe ID. 2010. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist* 16 (4):435–52

- Stence N, Waite M, Dailey ME. 2001. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia* 3 (33):256–66
- Tam WY, Ma C. 2014. Bipolar/rod-shaped microglia are proliferating microglia with distinct M1/M2 phenotypes. *Sci Rep* 4 (7279):1–7
- Teismann P. 2012. COX-2 in the neurodegenerative process of Parkinson's disease. *BioFactors* 38 (6):395–97
- Tsang A, Chung K. 2009. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Acta* 1792 (7):643–50
- Ullrich O. 2005. Das Immunsystem des ZNS. Molekulare Mechanismen der Balance zwischen Schutz und Schädigung. *Magdeburger Wissenschaftsjournal* 1-2:3–12
- Wang CX, Shuaib A. 2002. Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury. *Prog Neurobiol* 67 (2):161–72
- Wilms H, Rosenstiel P, Sievers J, Deuschl G, Zecca L, Lucius R. 2003. Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. *FASEB J* 17 (3):500–20
- Wilms H, Sievers J, Rickert U, Rostami-Yazdi M, Mrowietz U, Lucius R. 2010. Dimethylfumarate inhibits microglial and astrocytic inflammation by suppressing the synthesis of nitric oxide, IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 in an in-vitro model of brain inflammation. *J Neuroinflammation* 7 (30):1–8
- Wu T, Hsu C, Huang H, Chou S, Wu H. 2007. Proteomic analysis of pycnogenol effects in RAW 264.7 macrophage reveals induction of cathepsin D expression and enhancement of phagocytosis. *J Agric Food Chem* 55 (24):9784–91
- Xia Q, Hu Q, Wang H, Yang H, Gao F, Ren H, Chen D, Fu C, Zheng L, Zhen X, Ying Z, Wang G. 2015. Induction of COX-2-PGE2 synthesis by activation of the MAPK/ERK pathway contributes to neuronal death triggered by TDP-43-depleted microglia. *Cell Death Dis* 6 (1702):1–11

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name :	Vollenberg
Vorname :	Clara Johanna
Geburtsdatum :	25.03.1990
Geburtsort :	Dortmund
Staatsangehörigkeit :	deutsch
Familienstand :	ledig

Universitärer Werdegang

WS 2009/10	Immatrikulation an der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel (CAU) im Fach Zahnmedizin (Staatsexamen)
23.09.2010	Naturwissenschaftliche Vorprüfung (Vorphysikum)
23.03.2012	Zahnärztliche Vorprüfung (Physikum)
5.12.2014	Zahnärztliche Prüfung (Staatsexamen)

Schulischer Werdegang

1996 – 2000	Liebig Grundschule, Dortmund
2000 – 2009	Mallinckrodt-Gymnasium, Dortmund
27.06.2009	Abitur/ Allgemeine Hochschulreife

Famulaturen

22.07.2013. - 17.09.2013	Zahnärztliche Famulatur in Peru, organisiert und begleitet durch das Deutsche Rote Kreuz e.V.
--------------------------	---

Berufliche Tätigkeit

03/2015-07/2015	Wissenschaftliche Mitarbeiterin CAU, Kiel, Anatomisches Institut Kursus der Mikroskopischen Anatomie II
Seit 10/2015	Assistenz Zahnärztin Praxis Dres.med.dent. Holger Hasche & Anja-Katrin Zahl, Wahlstedt

Praktika

03/2011	„life Dental GmbH“ Dentallabor, Dortmund
02/2013	Praxis Dr.med.dent. M Morgenstern, Bad Kreuznach

Sprachkenntnisse

Englisch	fließend in Wort und Schrift
Französisch	fließend in Wort und Schrift
Spanisch	fließend in Wort und Schrift

Wissenschaftliche Posterpublikationen

31. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Kiel

Vollenberg C, Wilms H, Arnold P, Lucius R, Rickert U (2015)

Pycnogenol® attenuates Microglia-mediated neuroinflammation

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ralph Lucius für die Überlassung meines Promotionsthemas und die Bereitstellung des Laborarbeitsplatzes zur Durchführung der notwendigen Experimente. Die hervorragende persönliche Betreuung und das mir entgegengebrachte Vertrauen in allen Phasen der Erstellung dieser Arbeit haben mich insbesondere in den schwierigen Momenten dieses Forschungsprojektes immer motiviert und unterstützten mich bei der Fertigstellung.

Für die Einführung in die wissenschaftlichen Arbeitsweisen und die Begleitung bei der Auswertung dieser Arbeit gilt ein großer Dank Frau Dr. rer. nat. Uta Rickert; ich habe schöne Erinnerungen an unsere gemeinsame Zeit im Büro mit der lebhaften Urwald-Zimmerpflanze.

Ganz herzlich danken möchte ich an dieser Stelle meiner Arbeitsgruppe für die nette Aufnahme im Labor und das angenehme Arbeitsklima: Frau Monika Grell, Frau Gaby Steinkamp, Frau Marion Kölln, Frau Katrin Neblung-Masuhr. Sie führten mich in die verschiedenen labortechnischen Methoden ein und standen mir bei der Durchführung meiner Versuche stets mit Rat und Tat zur Seite.

Dank auch an Ottfried Frandsen für seine schnelle und kompetente Hilfe bei kniffligen EDV-Angelegenheiten und der Bekämpfung von Computerviren.

Clemens Franke unterstützte mich bei der grafischen Ausarbeitung dieser Arbeit; die Schönheitskorrekturen und sein kreativer Input bei der Gestaltung der Schaubilder in dieser Dissertation waren mir eine große Hilfe, vielen Dank dafür.

Ich danke Horphag Research, Genf, Schweiz, die freundlicherweise eine Probe der Substanz Pycnogenol® zur Durchführung dieser Studie bereitstellten.

Besonders möchte ich mich bei meinem Freund Jonas Conrad bedanken, der mich immer wieder mit positivem Denken ermutigte und mir auch in fachlicher Hinsicht zur Seite stand.

Schlussendlich gilt mein größter Dank meinen Eltern, Cornelia und Christoph Vollenberg, für ihre unablässige Unterstützung und Fürsorge in allen Lebensphasen.